

Woner Mion

Foto Seleção de Mielomas e Hibridomas murinos na  
produção de Anticorpos Monoclonais

Botucatu 2014

# Woner Mion

## Foto Seleção de Mielomas e Híbridomas Murinos na produção de Anticorpos Monoclonais

Dissertação apresentada a Faculdade de  
Medicina, Universidade Estadual  
Paulista “Julio de Mesquita Filho”,  
campus de Botucatu, para obtenção do  
título de Mestre em pesquisa e  
Desenvolvimento: Biotecnologia Médica

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Elenice Deffune

Botucatu 2014

*Dedicatória*

A minha mãe pela dedicação e apoio incondicional a minha pessoa. Mãe te amo.

A minha esposa Vitória, pelo incentivo, companheirismo, pela paciência, confiança e o mais importante, o amor. Esta tese tem muito de você e sem sua presença seria impossível concluí-la. Te amo muito nega.

## *Agradecimientos*

## Agradecimentos

Agradeço a Deus pela oportunidade da vida e pela possibilidade de finalizar mais uma etapa na minha vida, assim como faço justos agradecimentos aos Orixás, em especial a São Cosme, Damião e Doum.

Agradeço ao meu amigo Carlos Alberto Pereira e sua mãe Adelina pelo incentivo árduo na concretização do meu sonho.

Meus sinceros agradecimentos:

Aos meus familiares, em especial a minha sobrinha-filha Erika Mion, pelo apoio e compreensão desses anos de luta.

A Profa. Dra. Elenice Deffune exemplo de profissional, professora de genialidade irrefragável que acreditou em mim e proporcionou a realização deste trabalho, além de exercer com maestria a função de ensinar.

Ao Prof. Dr Vanderlei Bagnato pela cooperação, auxílio e ideias para a realização deste metrado.

A Dra Natalia Inada pela orientação, auxílio e o desenvolvimento deste trabalho.

A Dra Roosana, eterna mãezona do laboratório, pelos conselhos em momentos atribulados, sabendo ouvir e aconselhando que rumo seguir. Foi uma honra tê-la na minha banca de qualificação.

Ao Prof. Dr Silvio Govone pela realização dos testes estatísticos e orientação.

Ao meu ~~brother~~” Angelo Govone pelas horas intermináveis de conversa por telefone e inúmeros emails discutindo resultados e duvidas que surgiram durante a realização do estudo.

A todos da Equipe do Laboratório de Engenharia Celular pela compreensão, apoio e companheirismo. Valeu Galera!!!

A Josy, sua ajuda e apoio com as culturas celulares foram indispensáveis para elaboração e desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigado ~~Fia~~”.

A Dra Majore responsável pelo Laboratório de Citometria de Fluxo pelo auxílio e sugestões dadas para realização dos teste e concomitantemente para a concretização deste trabalho.

A Mariana Sartori ~~—Crazy People~~” pelo apoio, dedicação e profissionalismo nas análises de Citometria de Fluxo, mesmo em horários insanos, essenciais para a conclusão deste trabalho. Valeu!!!

À querida Ângela pela ajuda com a Microscopia de fluorescência.

À Ondina pela ajuda pelo auxílio com os insumos de laboratório e pelo cafezinho —“a corda estudante vai pesquisar”. Obrigado.

À Janisse pelas chamadas de atenção decorrência dos esquecimentos das datas de rematrícula.

Faço um agradecimento especial as meninas da higienização, pois sem o trabalho delas não poderíamos realizar com prazer as nossas atividade laboratoriais.

*Epígrafe*



**“ O tempo é o melhor autor;  
sempre encontra um final perfeito”**

Charles Chaplin

## SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE TABELAS

LISTA DE GRÁFICOS

LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                     |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. INTRODUÇÃO.....                                                                                                  | 22 |
| 1.1 ANTICORPOS MONOCLONAIS .....                                                                                    | 23 |
| 1.2 ANTICORPO MONOCLONAL CONTRA <i>Staphylococcus Aureus</i><br>RESISTENTE À METICILINA (MRSA).....                 | 27 |
| 1.3 DISPOSITIVOS LED.....                                                                                           | 27 |
| 1.4 CONCEITOS FÍSICOS DA IRRADIAÇÃO: IRRADIÂNCIA,<br>FLUÊNCIA E ENERGIA DEPOSITADA.....                             | 29 |
| 1.5 FOTOTERAPIA.....                                                                                                | 29 |
| 1.6 INTERAÇÃO DA LUZ COM TECIDOS BIOLÓGICOS.....                                                                    | 33 |
| 1.7 TERAPIA FOTODINÂMICA .....                                                                                      | 38 |
| 1.8 FOTOSSENSIBILIZADORES.....                                                                                      | 40 |
| 1.8.1 PORFIRINAS.....                                                                                               | 40 |
| 1.9 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA.....                                                                                 | 42 |
| 1.9.1 APLICAÇÕES DOS MABS.....                                                                                      | 42 |
| 2. OBJETIVOS.....                                                                                                   | 43 |
| 3. MATERIAL E MÉTODO.....                                                                                           | 45 |
| 3.1 CULTURA CELULAR.....                                                                                            | 46 |
| 3.2 PRODUÇÃO DE HIBRIDOMA ANTI-MRSA.....                                                                            | 46 |
| 3.3 PROTOCOLO ELISA INDIRETO.....                                                                                   | 47 |
| 3.4 DESCONGELAMENTO .....                                                                                           | 48 |
| 3.5 CULTIVO CELULAR.....                                                                                            | 48 |
| 3.6 PROTOCOLO DE IRRADIAÇÃO DAS CÉLULAS.....                                                                        | 49 |
| 3.7 DETERMINAÇÃO DAS VIABILIDADES CELULARES.....                                                                    | 51 |
| 3.7.1 COLORAÇÃO: TRYPA BLUE (STROBER, 2001).....                                                                    | 51 |
| 3.7.2 DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE POR MTT.....                                                                      | 51 |
| 3.7.3 DETERMINAÇÃO DOS ÍNDICES DE APOPTOSE E NECROSE<br>POR CITOMETRIA DE FLUXO NO MESMO INTERVALO DE<br>TEMPO..... | 52 |
| 3.7.3.1 ANÁLISE DE DISPERSÃO CELULAR.....                                                                           | 53 |
| 3.8 DOSAGEM DE PROTEÍNAS.....                                                                                       | 53 |
| 3.9 MENSURAÇÃO DA TEMPERATURA.....                                                                                  | 53 |

|                                                          |            |
|----------------------------------------------------------|------------|
| <b>3.10 ESTATÍSTICA.....</b>                             | <b>54</b>  |
| <b>4 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>                   | <b>55</b>  |
| <b>4.1 MORFOLOGIA.....</b>                               | <b>59</b>  |
| <b>4.2 CRESCIMENTO CELULAR.....</b>                      | <b>65</b>  |
| <b>4.3 DOSAGEM DE IMUNOGLOBULINA (NANODROP®).....</b>    | <b>71</b>  |
| <b>4.4 VIABILIDADE CELULAR.....</b>                      | <b>75</b>  |
| <b>4.5 MEDIDA DA TEMPERATURA DO MEIO DE CULTURA.....</b> | <b>92</b>  |
| <b>5. CONCLUSÕES.....</b>                                | <b>95</b>  |
| <b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>                | <b>97</b>  |
| <b>ANEXO.....</b>                                        | <b>107</b> |

*Resumo*

## RESUMO

A produção de anticorpos monoclonais (mAbs) é de extrema importância na área médica, sendo considerada a grande inovação da indústria biotecnológica. O método descrito por Köhler e Milstein exige a seleção celular por vias bioquímicas através do meio HAT (meio com hipoxantina, aminopterina e timidina). Com o crescente emprego da luz na área médica este trabalho buscou avaliar o emprego do LED (abreviação de Light Emitting Diode) com comprimento de onda de 475nm na seleção das células envolvidas na produção de anticorpos monoclonais com vistas a oferecer uma nova opção na seleção de hibridomas. Culturas celulares de Mieloma Murino (NS1) e MRSA 3-75 e 4-27 em meio completo 10% SFB foram segregadas em seis grupos para cada tipo celular (12 amostras), sendo: G1: controle (não irradiado); G2: 1 J/cm<sup>2</sup>; G3: 3 J/cm<sup>2</sup>; G4: 5 J/cm<sup>2</sup>; G5: 10 J/cm<sup>2</sup>; G6: 20 J/cm<sup>2</sup>. Com vistas a determinar o comportamento das células frente ao efeito da luz, foram avaliadas a taxas de viabilidades das células por Citometria de fluxo e MTT (3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide), perfil secretor dos hibridomas por ELISA e nanodrop e taxa crescimento celular pela coloração de Azul de Tripán. Os resultados mostraram que houve bioinibição de NS1 e MRSA 3-75 e 4-27 em doses superiores a 5 J/cm<sup>2</sup> promoveram aumento da morte por necrose e apoptose tardia com supressão da produção de anticorpos (hibridomas) em todos os grupos experimentais. Os Hibridomas MRSA 4-27 apresentaram bioestimulação quanto a produção de anticorpos em 31% na dose de 1 J/cm<sup>2</sup> porém, o MRSA 3-75 não apresentou alteração no perfil secretor. O LED no comprimento de onda de 475nm não promoveu fotoseleção de mielomas e hibridomas após exposição à luz. Mas, bioestimulou o crescimento celular (NS1) e promoveu aumento da secreção de imunoglobulinas (MRSA 4-27), principal interesse dos laboratórios de bioengenharia que utilizam esta tecnologia.

**Palavras chaves:** LED (*Light Emitting Diode*), Hibridoma, Mieloma, Fotoseleção.

## ABSTRACT

The production of monoclonal antibodies (mAbs) for medicine is highly important, being considered the greatest innovation of the biotechnologic industry over the years. The method described by Köhler e Milstein demands cellular selection through biochemistry ways using HAT (culture medium with hypoxanthine, aminopterin and thymidine). By the increasing use of lights in the medical areas, this paper searches to evaluate the application of LED (Light Emitting Diode) - wave length of 475nm - in the selection of cells involved on monoclonal antibodies production, in order to offer a new option for hybridoma selection. Cell culture of Murine Myeloma (NS1) and MRSA 3-75 and 4-27 in complete culture medium with 10% of fetal bovine serum (FBS) were separated in six groups for each cellular type (12 samples), being: G1: control group (not irradiated), G2: 1 J/cm<sup>2</sup>; G3: 3 J/cm<sup>2</sup>; G4: 5 J/cm<sup>2</sup>; G5: 10 J/cm<sup>2</sup>; G6: 20 J/cm<sup>2</sup>. To determine the behavior of cells, the following tests were made: viability tests by Flow Cytometry and MTT (3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide), ELISA and Emission Spectrometry to check hybridomas' secretory profile and Tripan blue stain to determine cellular growth rate. The results show that there were bioinstimulation of NS1 and MRSA 3-75 and 4-27 in doses above of 5 J/cm<sup>2</sup>, which promoted the increase of death by necrosis and late apoptosis with the reduction of monoclonal antibodies production (hybridoma) in all experimental groups. The MRSA 4-27 hybridomas presented biostimulation as for the antibodies production in 31% at the dose of 1 J/cm<sup>2</sup>, although the MRSA 3-75 didn't present any alteration of secretory profile. The LED with wave length of 475nm didn't promoted photoselection of hybridomas and myelomas after the exposure to light. However, it biostimulated the cellular growth (NS1) and the increased the secretion of immunoglobulins (MRSA 4-27), which is the main interest of bioengineering labs that uses this kind of technology.

**Key words:** LED (*Light Emitting Diode*), Hybridoma, Myeloma, Photoselection

## *Lísta de Figuras*

## LISTAS DE FIGURAS

|                  |                                                                                                                                                                           |    |
|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1</b>  | Protocolo de produção de anticorpo monoclonal. Modificado (OSBORNE, 2008).....                                                                                            | 24 |
| <b>Figura 2</b>  | Fluxograma da produção de mAbs (SOUZA, 2009).....                                                                                                                         | 26 |
| <b>Figura 3</b>  | Figura representativa do LED(FREITAS, 2009)Relativos picos de absorção da hemoglobina são: 280 nm, 420 nm, 540 nm e 580 nm. (Boulnois 1986).....                          | 28 |
| <b>Figura 4</b>  | Interação da luz com a matéria(NIEMZ, 2007).....                                                                                                                          | 33 |
| <b>Figura 5</b>  | Desenho didático ilustrando o coeficiente de absorção e penetração da Luz em função do seu comprimento de onda.....                                                       | 34 |
| <b>Figura 6</b>  | Esquema ilustrativo para explicação da Lei de Beer-Lambert.....                                                                                                           | 34 |
| <b>Figura 7</b>  | Interação Luz–Tecido. Os círculos apresentam uma estimativa grosseira dos parâmetros associados aos efeitos entre interação Luz-Tecido. Modificado por Boulnois 1986..... | 36 |
| <b>Figura 8</b>  | Esquema das reações primárias foto induzidas na célula(MENEGUZZO, 2007).....                                                                                              | 37 |
| <b>Figura 9</b>  | Mecanismo das Reações secundarias a partir do estímulo por Fototerapia(MENEGUZZO, 2007).....                                                                              | 38 |
| <b>Figura 10</b> | Princípio Básico da Terapia Fotodinâmica(DOUGHERTY, THOMAS J et al., 1998).....                                                                                           | 39 |
| <b>Figura 11</b> | Diagrama de Jablonski demonstrando a geração do Oxigênio singlete, fluorescência, absorção, fosforescência .....                                                          | 40 |
| <b>Figura 12</b> | Fórmula estrutural comum das Porfirinas(DU et al., 2003).....                                                                                                             | 41 |
| <b>Figura 13</b> | Espectro de absorção do Photogem <sup>®</sup> .....                                                                                                                       | 41 |
| <b>Figura 14</b> | Fluxograma experimental.....                                                                                                                                              | 49 |
| <b>Figura 15</b> | –Bio Table” acionada com $\lambda$ 475nm $\pm$ 20 nm com potência de 35 mW/cm <sup>2</sup> com emissão continua.....                                                      | 50 |
| <b>Figura 16</b> | Foto Hemocitômetro.....                                                                                                                                                   | 51 |
| <b>Figura 17</b> | Representação da análise de dispersão de célula marcada com Anexina V e PI.....                                                                                           | 53 |



|                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |    |
|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 18</b> | Fotodocumentação das três linhagens celulares estudadas: Mieloma Murino, MRSA 3-75 e MRSA 4-27.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 58 |
| <b>Figura 19</b> | Cultura celular.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 59 |
| <b>Figura 20</b> | Fotodocumentação das culturas de NS1 irradiadas e controles nos momento de 24, 72 e 120 horas após início do experimental.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 61 |
| <b>Figura 21</b> | Fotodocumentação das culturas de MRSA 4-27 irradiadas e controles nos momento de 24, 72 e 120 horas após início do experimental.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 62 |
| <b>Figura 22</b> | Fotodocumentação das culturas de MRSA 3-75 irradiadas e controles nos momento de 24, 72 e 120 horas após início do experimental.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 63 |
| <b>Figura 23</b> | (A) Efeito da irradiação com tempo de exposição de 5 minutos em fibroblastos de gengivas humanas. (B) Caracterização dos efeitos da irradiação com tempo de exposição de 5 minutos na ultraestrutura mitocondrial. No núcleo: as setas brancas apresentam as características normais da mitocondria. As setas negras mostram que a maioria das mitocondria foram danificados apresentando cristais, vacúolos aumentados após a irradiação (YOSHIDA et al., 2013). ..... | 65 |
| <b>Figura 24</b> | Foto A - placa de leitura de teste MTT, foto B indica aspecto microscópico das células coradas por formazan (1: célula com atividade mitocondrial, 2 célula sem atividade mitocondrial).....                                                                                                                                                                                                                                                                            | 77 |

## *Lísta de Tabelas*

## LISTA DE TABELAS

|                 |                                                                                                                                       |    |
|-----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1</b> | Cores associados a Semicondutores .....                                                                                               | 28 |
| <b>Tabela 2</b> | Bandas de ação de Bioestimulação e Bioinibição em culturas celular para diferentes comprimentos de onda e dose(KARU, T.I., 1990)..... | 32 |
| <b>Tabela 3</b> | Tempo de exposição por dose.....                                                                                                      | 50 |
| <b>Tabela 4</b> | Contagem celular do NS1 em função do tempo.....                                                                                       | 66 |
| <b>Tabela 5</b> | Números de células do hibridoma MRSA 4-27 em função do tempo.....                                                                     | 68 |
| <b>Tabela 6</b> | Números de células do híbrido MRSA 3-75 em função do tempo. ....                                                                      | 69 |
| <b>Tabela 7</b> | Síntese de imunoglobulina do hibridoma MRSA 4-27.....                                                                                 | 72 |
| <b>Tabela 8</b> | Síntese de imunoglobulina do hibridoma MRSA 3-75.....                                                                                 | 73 |

## *Lísta de Gráficos*

## LISTA DE GRÁFICOS

|                   |                                                                                                                                     |    |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Gráfico 1</b>  | Curva de crescimento do mieloma murino (NS1) e dos hibridomas (MRSA 4-27 e MRSA 3-75) ao longo de 28 dias de cultura.....           | 57 |
| <b>Gráfico 2</b>  | Contagem celular do NS1 em função do tempo.....                                                                                     | 57 |
| <b>Gráfico 3</b>  | Crescimento celular em função da dose e tempo entre grupos irradiados com LED no $\lambda$ 475 nm e grupo controle do NS1.....      | 67 |
| <b>Gráfico 4</b>  | Crescimento celular em função da dose e tempo entre grupos irradiados com LED no $\lambda$ 475 nm e grupo controle do MRSA 4-27.... | 69 |
| <b>Gráfico 5</b>  | Crescimento celular em função da dose e tempo entre grupos irradiados com LED no $\lambda$ 475 nm e grupo controle do MRSA 3-75.... | 70 |
| <b>Gráfico 6</b>  | Quantificação da concentração de imunoglobulina sintetizada pelo hibridoma MRSA 4-27.....                                           | 73 |
| <b>Gráfico 7</b>  | Quantificação da concentração de imunoglobulina sintetizada pelo hibridoma MRSA 3-75.....                                           | 74 |
| <b>Gráfico 8</b>  | Viabilidade da Cultura. Análises de curvas de sobrevivência .....                                                                   | 89 |
| <b>Gráfico 9</b>  | Avaliação da DO pelo teste ELISA do hibridoma MRSA 4-27. Efeito de bioestimulação dose de $1\text{J}/\text{cm}^2$ .....             | 91 |
| <b>Gráfico 10</b> | Avaliação da DO pelo teste ELISA do hibridoma MRSA 3-75. Efeito de bioinibidor para as dose 5, 10 e $20\text{J}/\text{cm}^2$ .....  | 92 |
| <b>Gráfico 11</b> | Análise da temperatura dos grupos experimentais. ....                                                                               | 93 |

## *Introdução*

## 1. INTRODUÇÃO

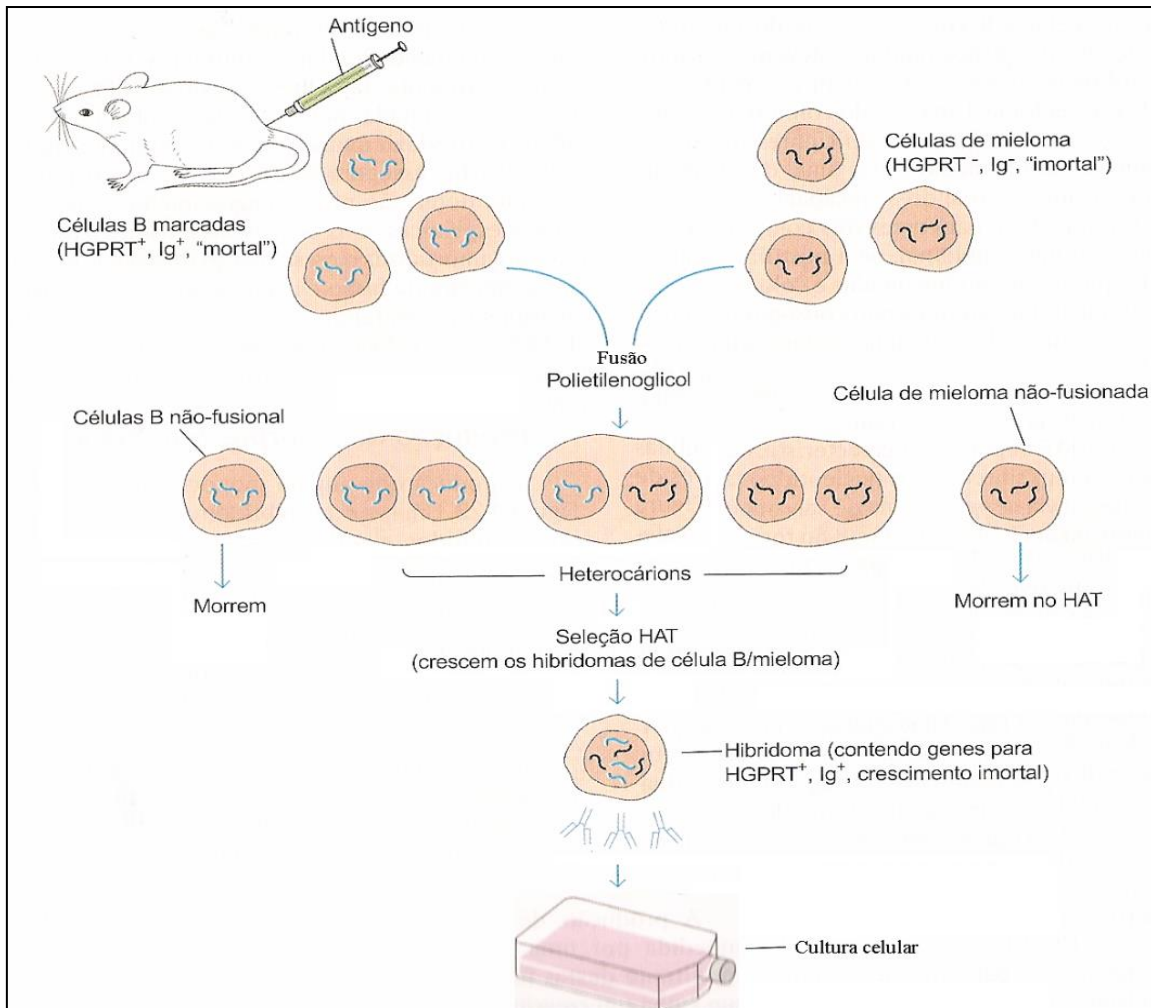
### 1.1 ANTICORPOS MONOCLONAIS

No século XX Paul Ehrlich propôs a teoria de que uma “bala mágica” poderia destruir seletivamente um alvo ou doença, evitando as interações indesejáveis em outros tecidos. Neste período a interação entre antígeno e anticorpo já era conhecida. Esta visão tornou-se prática com o desenvolvimento da tecnologia de hibridomas de Kohler e Milstein (1975) com a criação dos anticorpos monoclonais (mAbs) capazes de serem altamente específicos (ADAMS; WEINER, 2005).

Devido às suas origens murinas, os primeiros mAbs eram limitados devido à imunogenicidade e ineficazes na ativação da imunidade celular. Este início, foi superado com o desenvolvimento dos monoclonais quiméricos (apresentam combinação da região variável do anticorpo do camundongo com a região constante do anticorpo humano) e humanizados (contém somente regiões hipervariáveis do anticorpo do camundongo e o restante da molécula formada por anticorpo humano) (ADAMS; WEINER, 2005).

O crescente interesse nos mAbs os transformaram na grande inovação da indústria biotecnológica. Atualmente esta tecnologia representa um mercado lucrativo para as indústrias farmacêuticas, embora tenha surgido em 1975 com os pesquisadores Jerne, Milstein e Köhler (ganhadores do Prêmio Nobel de Fisiologia em 1984), em 2012 foram arrecadados cerca de 50 bilhões de dólares com mAbs, comparado com 48 bilhões em 2010 e 40 bilhões em 2009. (ALKAN, 2004).

O método de produção de anticorpos monoclonais (Köhler e Milstein, 1975) consiste em várias etapas que devem ser extremamente controladas quanto aos possíveis fatores de influência externa (tempo, pH, temperatura). Resumidamente, a técnica de produção de mAbs, inicia-se com a imunização do animal escolhido com o antígeno em questão. Após o desafio ao sistema imune através de imunizações seriadas ocorre a produção de linfócito B sensibilizados, os quais são obtidos com a esplenectomia para obtenção dos linfócitos sensibilizados (figura 1) (KÖHLER; MILSTEIN, 1975; DEFFUNE et al., 1992).



**Figura 1-** Protocolo de produção de anticorpo monoclonal. Modificado (OSBORNE, 2008)

A fusão é realizada com centrifugação dos linfócitos recém-coletados, juntamente com células de mieloma murino na proporção de 10:1, respectivamente, em meio acrescido de polietilenoglicol (PEG) que proporciona a fusão de membranas celulares (KÖHLER; MILSTEIN, 1975).

Nesta etapa três situações podem ocorrer:

1. Células fusionadas (linfócito B sensibilizado com Mieloma Múltiplo Murino) células de interesse na produção de anticorpos monoclonais;
2. Linfócitos não fusionados ou fusionados ao acaso entre si;
3. Mieloma Múltiplo Murino não fusionado ou fusionado ao acaso entre si.

As situações 2 e 3 são indesejadas, logo devem ser suprimidas. Os linfócitos são naturalmente extintos do cultivo, pois não conseguem replicar-se, e são removidos da cultura durante as trocas do meio. O mieloma é permanente e preocupante na cultura, pois defronte as suas características neoplásicas, apresenta intensa replicação



ultrapassando facilmente o crescimento das células fusionadas, culminando com concorrência e posterior seleção apenas deste tipo celular na cultura(VICENTINI-OLIVEIRA et al., 2010).

No intuito de eliminar os mielomas algumas de suas propriedades genômicas são requeridas como: hipermetilação e deficiência da enzima hipoxantina-guanina-fosforibosiltransferase (HGPRT), empregada na síntese de nucleotídeos. Células normais são HGPRT positivas enquanto o genoma do mieloma é HGPRT negativo, ou seja, não possui maquinário para sintetizar nucleotídeos utilizando o sistema HGPRT. Nesta etapa, 24 horas após fusão, as células recebem meio de cultura contendo o suplemento Hipoxantina-aminopterina-timidina (HAT). A aminopterina bloqueia a via *de novo*, restando somente a via de recuperação ou salvamento a ser utilizada para a formação de nucleotídeos. Com isto os hibridomas (HGPRT+ e secretores de imunoglobulinas (Ig)) e os linfócitos B não fusionados (HGPRT+) sobrevivem em meio HAT, já os mielomas não fusionados são incapazes de utilizar a via de salvamento (HGPRT-) e morrem. Os linfócitos B, embora HGPRT+ têm vida útil muito curta e não sobrevivem por mais de 6 dias durante o cultivo celular, restando apenas os Hibridomas no final do processo(VICENTINI-OLIVEIRA et al., 2010).

Para a obtenção dos clones produtores de Ig é realizada a diluição da suspensão de células com o intuito de isolar um único clone por poço de cultura, dando início a um cultivo homogêneo com a mesma secreção de Ig. A especificidade do clone selecionado é realizada por testes seriados do sobrenadante de cultura pela técnica de ELISA (*Enzyme linked immunosorbent assay*) indireto (ensaio imunoadsorvente ligado à enzima) ou por RIA (radioimunoensaio)(VICENTINI-OLIVEIRA et al., 2010).

Em suma, os protocolos de produção de monoclonais envolvem diversas etapas laboriosas para obtenção de Ig específicas contra o antígeno de interesse como ilustrado no fluxograma abaixo.

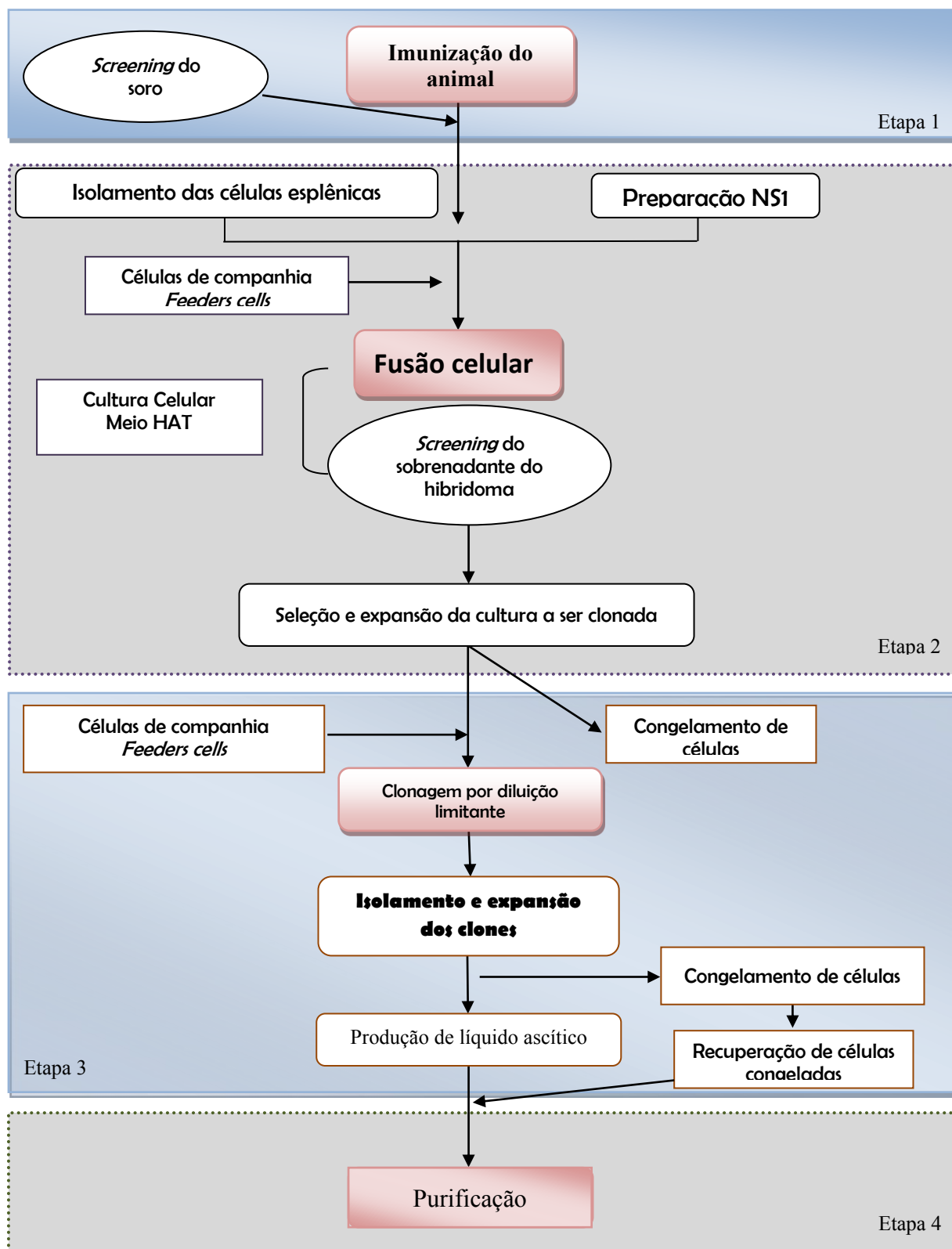


Figura 2 - Fluxograma da produção de mAbs(SOUZA, 2009)

## 1.2 ANTICORPO MONOCLONAL CONTRA *Staphylococcus Aureus* RESISTENTE À METICILINA (MRSA)

O *Staphylococcus aureus* é uma bactéria Gram positiva que coloniza pele e fossas nasais do homem predispondo a lesões purulentas em tecidos moles, bacteremia, sepse ou endocardiose. Devido ao surgimento de estirpes multi-resistentes à metilicina, denominadas MRSA, cresce o interesse no desenvolvimento de novas técnicas terapêuticas frente a *S. aureus* multiresistentes (LORENZ et al., 2011; KIM et al., 2012).

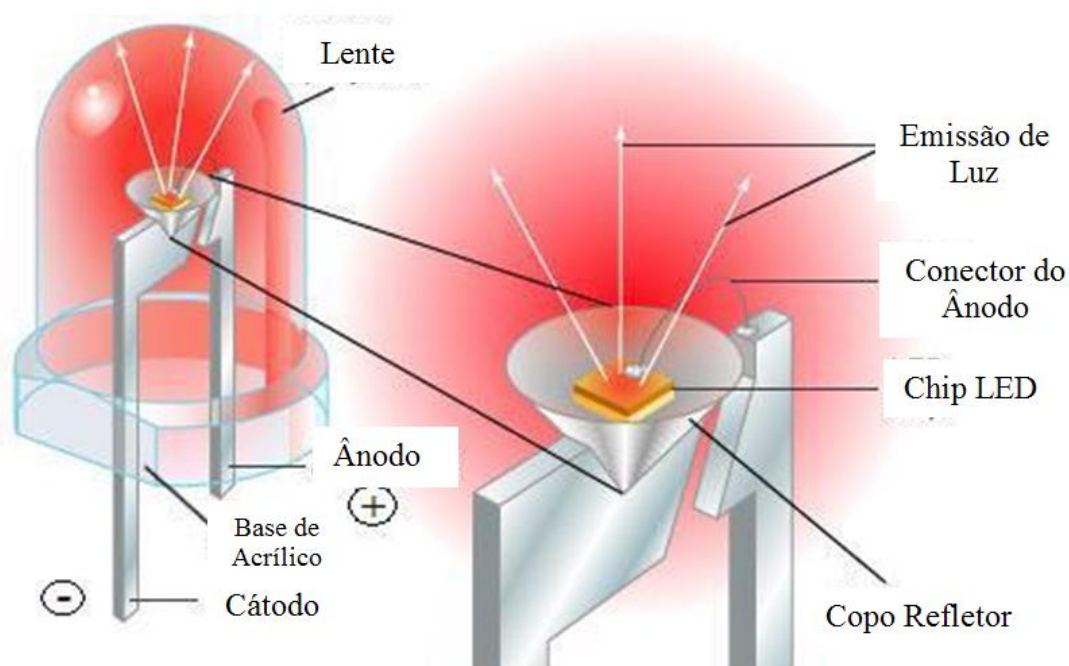
Com vistas a esta necessidade do mercado de biotecnologia e medicina foram produzidos 9 híbridos secretores de imunoglobulinas contra antígenos obtidos da extração de material molecular de cepa PBP2a *Staphylococcus aureus*, antígeno produzido segundo Blanco et al., 1995 (BLANCO et al., 1995; QUERINO, 2013). Dois desses híbridos foram selecionadas para realização deste trabalho.

Durante a seleção dos híbridos produzidos, mais de 90% das células construídas foram descartadas por apresentarem perda da especificidade, instabilidade na secreção das imunoglobulinas ou por serem poucos reativos. O aperfeiçoamento da produção de monoclonais ganha destaque e a redução dos custos com melhora na qualidade dos produtos finais impulsionam novas pesquisas e agregações as novas tecnologias como o LED.

## 1.3 DISPOSITIVOS LED

Em 1962 o pesquisador Nick Holonyak Jr. desenvolveu o primeiro LED capaz de emitir luz visível vermelha. O LED (abreviação de Light Emitting Diode) é um dispositivo composto por dois semicondutores ou mais semicondutores dopados adequadamente que emite luz quando uma tensão é aplicada.

A emissão da luz é possível devido a diferença entre os tipos de materiais que compõem os semicondutores, um semicondutor é “*n-doped*” enquanto o outro é “*p-doped*”. Os semicondutores “*n-doped*” possuem material com excesso de elétrons, enquanto o semicondutor “*p-doped*” têm carência de elétrons ou “Buracos Receptores”, que ao serem percorridos por uma tensão, permitem o cruzamento dos elétrons excedentes rearranjando entre as lacunas do material empobrecido de elétrons resultando na emissão de luz com particularidades especiais; banda espectral estreita, policromática e incoerente (BAGNATO, V.S., 2008) (figura 3).



**Figura 3** – Figura representativa do LED(FREITAS, 2009)

A intensidade da luz emitida será proporcional à intensidade da corrente que é disponibilizada no diodo. O comprimento de onda da emissão da luz pelo LED dependerá do tipo de dopagem que os semicondutores terão. Como exemplo, se a dopagem é feita com Fosfato de Arsênio de Gálio a emissão da luz visível pode ocorrer no vermelho ( $\sim 625 - 720$  nm) ou no amarelo ( $\sim 565-590$  nm) dependendo da concentração de Fósforo(CORAZZA, 2005) (tabela 1). O marco na aplicabilidade dos LED foi depois de 1993, quando o pesquisador Shuji Nakamura inovou a composição de semicondutores com Índio, Gálio e Nitrogênio (InGaN) permitindo a emissão de luz azul ( $\sim 440 - 485$  nm) de alto brilho artigo(BAGNATO, V.S., 2008).

| Semicondutor                       | Cor da luz    | Comprimento de onda |
|------------------------------------|---------------|---------------------|
| Arsenieto de gálio e alumínio      | Infravermelha | 880 nm              |
| Arsenieto de gálio e alumínio      | Vermelha      | 645 nm              |
| Fosfato de alumínio, índio e gálio | Amarela       | 595 nm              |
| Fosfato de gálio                   | Verde         | 565 nm              |
| Nitreto de gálio                   | Azul          | 430 nm              |

**Tabela 1** – Cores associados a Semicondutores - <http://www.solelux.com.br/tecnologia-led/historia-do-led> acessado 31/12/2013.

O LED é uma tecnologia bem difundida na vida moderna, a tal ponto que seu uso vem proliferando mundialmente; fototerapia de baixa intensidade, controle de microrganismo, Terapias Fotodinâmicas (PDT), foto polimerização, clareamento dentário, sistemas de automação, leitores de código de barra, semáforos, painéis de anúncio, celulares, dentre outros.

#### **1.4 CONCEITOS FÍSICOS DA IRRADIAÇÃO: IRRADIÂNCIA, FLUÊNCIA E ENERGIA DEPOSITADA**

Irradiância ou Intensidade é o termo que os fotobiologistas usam como sinônimo para densidade de potência (DP), definida pela razão da potência óptica útil do LASER ou LED, expressa em Watt, dividida pela área irradiada, expressa em centímetros quadrados ( $\text{cm}^2$ ). A unidade, portanto, é ( $\text{W}/\text{cm}^2$ ). Fluência ou Dose é o termo utilizado para descrever a taxa de energia que está sendo aplicada sobre uma área no tecido biológico. Ao multiplicarmos a irradiância pelo tempo de exposição, expresso em segundos (s), obteremos a fluência ou dose, também denominada de Densidade de Energia, será expressa em Joules por centímetro quadrado ( $\text{J}/\text{cm}^2$ ). Energia total é uma grandeza física que, no caso de Laserterapia ou Ledterapia, representa a quantidade de luz que está sendo depositado no tecido a qual é definida pela multiplicação da potência óptica útil do aparelho em Watts pelo tempo de exposição. O resultado obtido tem como representação a unidade Joule (**J**). Para uma dada potência, as variações na irradiância podem produzir efeitos sobre o tecido biológico que são nitidamente diferenciados. As quantidades de energia depositada, variações na dose, podem promover efeitos sobre os tecidos biológicos(LIZARELLI, R., 2010).

#### **1.5 FOTOTERAPIA**

As observações e estudos com a luz datam desde a antiguidade, os egípcios e gregos usaram o conhecimento sobre a luz para criar instrumentos para determinação do tempo, orientação astronômica e tratamentos de doenças dermatológicas. No início do século XIX Thomas Young observou o efeito ondulatório para luz, corroborando a ideia sugerida por Christian Huygens no século XVII, dando início a natureza quântica da luz. No final do século XIX e início do século XX, o Eletromagnetismo desenvolvido por James Clerk Maxwell e Heirich Rudolf Hertz conjuntamente com o desenvolvimento da Teoria da Mecânica Quântica estabelecidos por Max Planck, Albert Einstein, Werner Heisenberg, dentre outros, aliaram-se ao avanço da tecnologia

promovendo subsídios para a exploração da luz em diversas áreas de pesquisa e do conhecimento.

As fontes de emissão de luz LASER e LED de baixa intensidade são semelhantes do ponto de vista da luz emitida, pois ambas possuem uma banda espectral estreita, embora o LED tenha um espectro de ação eletromagnético mais amplo, fator importante para o seu uso na Terapia Fotodinâmica (PDT) e na odontologia, em relação ao LASER. A diferença básica dessas fontes está no fato de a luz emitida pelo LED é ausente de coerência e colimação(BAGNATO, V., 2002). Entre os benefícios do LED destacam-se: sua energia eficiente, seu tamanho compacto, baixa voltagem, baixo aquecimento, vida longa e silenciosa(LIZARELLI, R.F.Z. et al., 2008).

Hoje existe uma vasta literatura confirmando os efeitos da fototerapia, principalmente com uso do LASER, em culturas *in vitro*, modelos animais e testes clínicos(PEPLOW; CHUNG; BAXTER, 2010). Os efeitos bioestimuladores são marcados por aumento da taxa de proliferação celular, ampliação da taxa de produção de fibroblastos e síntese de colágenos e de RNA e DNA(KARU, T., 1989), síntese de ATP(LIEVENS, 1988), na micro circulação local(MIRO et al., 1984; MAIER; HAINA; LANDTHALER, 1990), proliferação de células epiteliais(STEINLECHNER; DYSON, 1993), fibroblastos(LUBART et al., 1995; WEBB; DYSON; LEWIS, 1998; ALMEIDA-LOPES et al., 2001), e, síntese de colágeno(ENWEMEKA; RODRIGUEZ; MENDOSA, 1990; SKINNER et al., 1996). Ademais, melhora na cicatrização em feridas crônicas foram publicadas(TRELLES; MAYAYO, 1987; BIHARI; MESTER, 1989; ROCHKIND et al., 1989; BAXTER; DIAMANTOPOULOS, 1994; KAMEYA et al., 1995; TANG et al., 1997; REDDY; STEHNO-BITTEL; ENWEMEKA, 1998), e a regulação gênica de 111 genes segregados em categorias funcionais distintas que regulam os efeitos oxidantes, canais iônicos, potencial de membrana, proliferação celular, proteínas do citoesqueleto matriz extracelular, fatores de transcrição de citosinas imunológicas, inflamatórias e de reparos celulares(ZHANG et al., 2003).

O uso da fototerapia como recurso terapêutico ampliou-se na última década. Estudos desenvolvidos pela NASA (*National Aero Space Agency*) nos Estados Unidos demonstraram fortes evidências de que a eficiência dos LEDs em processos de foto estimulação celular e de proliferação de crescimento celular *in vitro*(WHELAN et al., 2001). Testes clínicos com aplicação de LEDs em cicatrização de úlceras em seres humanos já foram liberados pela FDA (*Food Drug Administration*) norte-americana(WHELAN et al., 2003). Trabalhos desenvolvidos no Brasil demonstram a

eficiência do LED na cicatrização de úlceras(MARQUES et al., 2004; CORAZZA et al., 2007).

Ainda com vistas à aplicação terapêutica do LED de baixa intensidade, seu uso em células-tronco de polpa dentária humana, potencializou o crescimento das células *in vitro* em condições de déficit nutricional. Essa resposta celular está ligada à estreita relação da interação da luz e estresse oxidativo no momento da irradiação, sendo que células mais propensas a oxidação, apresentam maior crescimento celular e células em fase de redução apresentam inibição do crescimento(LI; CHEN; WANG, 2006).

Dentre as aplicações da fototerapia em células mononucleares de sangue periférico *in vitro*, Gulsoy e colaboradores relataram a proliferação dos linfócitos irradiados com LASER com comprimento 660nm nas doses de 1,5 e 3,0 J/cm<sup>2</sup>, no entanto, doses superiores não apresentaram efeitos bioestimuladores(GULSOY et al., 2006).

Pesquisas recentes inferem o potencial bioestimulador ou bioinibidor do LED ou do LASER de baixa intensidade estão relacionados com o tipo e metabolismo das células irradiadas. Além destes, a resposta a luz está relacionada diretamente aos parâmetros físicos da fototerapia como fluência (dose), potência (quantidade de energia transmitida), densidade de energia (irradiância), tempo de exposição e comprimento de onda (Tabela 2)(KARU, T., 1989).

Moore e colaboradores observaram que células endoteliais e fibroblastos com uma mesma irradiância e dose, mas com comprimentos de onda distintos, apresentaram resultados diferentes em relação à proliferação celular. A irradiação com Laser de baixa intensidade com comprimento de onda de 630 nm apresentaram resultados de bioestimulação, no entanto com comprimento de 830 nm houve um efeito bioinibidor para as células(MOORE et al., 2005).

A bioinibição celular após aplicação da luz azul desperta interesse na terapia antineoplásica, e na redução do desenvolvimento de tumores de pele em modelo experimental(OHARA et al., 2003). AL-WATBAN observou a indução de apoptose em culturas celulares de fibrosarcoma murino (RIF-1) e adenocarcinoma mamário murino (EMT-6) após fototerapia com comprimentos de onda entre 420 e 600nm(AL-WATBAN; ANDRES, 2012).

Células de retina apresentaram apoptose promovida possivelmente por dano mitocondrial direto e aumento do estresse oxidativo, comprometendo o metabolismo da organela após tratamento com luz azul(KNELLS et al., 2011). Na dermatologia a luz azul

apresentou os melhores resultados na eliminação do *Propionibacterium acnes* superando a luz vermelha tradicionalmente usada(CHOI et al., 2011).

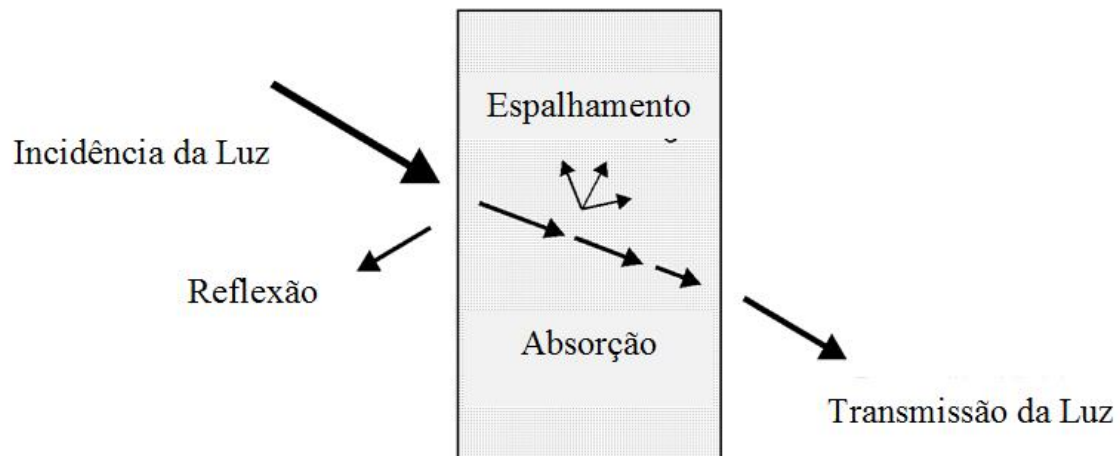
| Wavelength nm                | Culture                                         | Stimulation                                                                                                                                    | Inhibition                                                         |
|------------------------------|-------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
|                              |                                                 | Dose, J/m <sup>2</sup>                                                                                                                         | Dose, J/m <sup>2</sup>                                             |
| 400                          | HU-274                                          | 10 <sup>4</sup>                                                                                                                                | 10 <sup>5</sup> -10 <sup>6</sup>                                   |
|                              | WI-38                                           |                                                                                                                                                |                                                                    |
| 441.6                        | Human                                           | 10 <sup>3</sup> -10 <sup>4</sup>                                                                                                               | 10 <sup>5</sup> -10 <sup>6</sup>                                   |
| 632.8                        | embryonic                                       |                                                                                                                                                |                                                                    |
| 694.3                        | skin                                            |                                                                                                                                                |                                                                    |
| 741                          | fibroblasts                                     |                                                                                                                                                |                                                                    |
| Cool white fluorescent lamps | Human embryonic diploid lung fibroblasts        | Dose not shown. Exposition every day during 150 days for 2 h: cells came through 70 divisions; 40 h:60 div.; 6 h:53 div.; dark control: 53 div | Dose not shown. The cells exposed constantly, died within 2-3 days |
| 405                          | Human lymphoblastoid cells                      | -                                                                                                                                              | 10 <sup>5</sup>                                                    |
| 630-633                      | Chinese hamster fibroblasts                     | 10 <sup>3</sup>                                                                                                                                | -                                                                  |
| 632.8                        | L                                               | 7.5                                                                                                                                            | -                                                                  |
| 632.8                        | Human embryonic foreskin fibroblasts            | 10 <sup>2</sup>                                                                                                                                | -                                                                  |
| 632.8                        | HeLa                                            | 10 <sup>2</sup>                                                                                                                                | -                                                                  |
| 546-579                      | HeLa                                            | Dose not shown, dose rate 10-50 W/cm <sup>2</sup>                                                                                              | dose not shown, dose rate 100-300 W/cm <sup>2</sup>                |
| 694.3                        | Human skin fibroblasts                          | (1-4)x10 <sup>3</sup>                                                                                                                          | -                                                                  |
| 694.3                        | Human melanoma in culture                       | (2.4-48)x10 <sup>6</sup>                                                                                                                       | -                                                                  |
| 694.3                        | Mouse fibroblasts L929                          | 10 <sup>5</sup>                                                                                                                                | -                                                                  |
| 694.3                        | Human epidermal and mouse lung cells in culture |                                                                                                                                                | No damage till 10 J/m <sup>2</sup>                                 |

**Tabela 2** - Bandas de ação de Bioestimulação e Bioinibição em culturas celular para diferentes comprimentos de onda e dose(KARU, T.I., 1990).



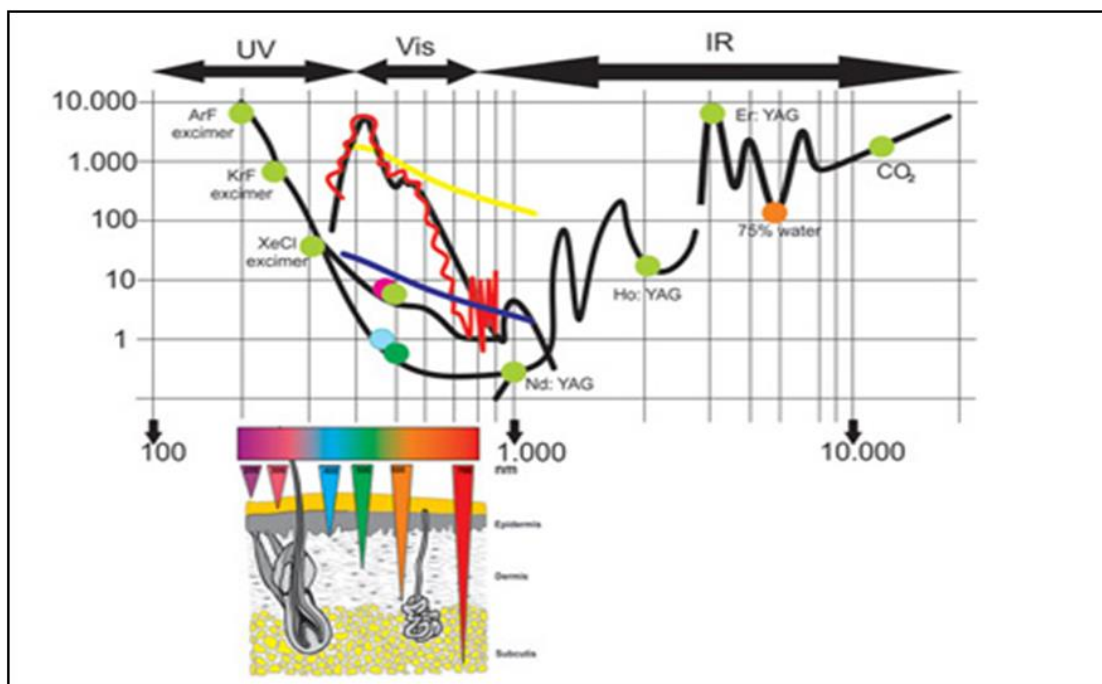
## 1.6 INTERAÇÃO DA LUZ COM TECIDOS BIOLÓGICOS

Os processos ópticos básicos na interação da luz incidente sobre a matéria obedecem aos princípios de reflexão e refração, as quais são correlacionadas: absorção e espalhamento (Figura 4). Contudo, os processos que regem a interação da luz visível de baixa intensidade com os tecidos biológicos são a absorção e o espalhamento, pois a reflexão e refração são consideradas secundárias e de menor destaque (NIEMZS, 2004).



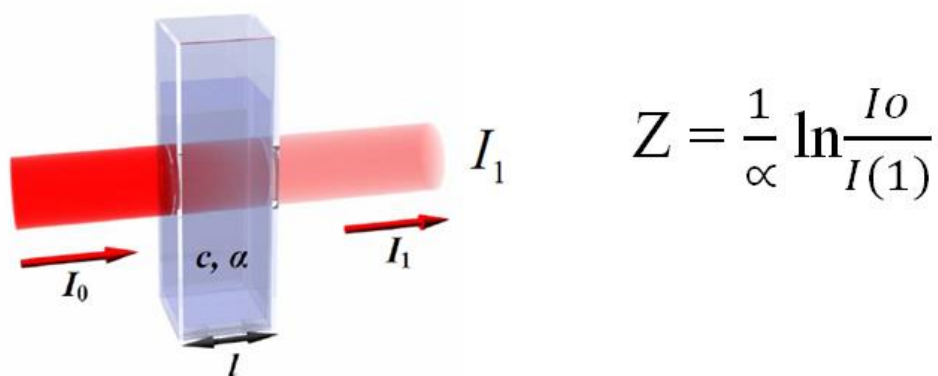
**Figura 4** - Interação da luz com a matéria(NIEMZ, 2007)

O processo de absorção da intensidade de uma onda eletromagnética incidente é atenuado fornecendo energia para o material. A capacidade de um meio de absorver radiação eletromagnética depende de alguns fatores, principalmente, camada eletrônica de seus átomos e constituição de suas moléculas, o comprimento de onda da radiação, a espessura da camada absorvente interna e parâmetros como a temperatura ou concentração de agentes de absorção, forma de emissão das ondas eletromagnéticas (contínua, pulsada), tempo de exposição, dentre outros (figura 5)(LUBART et al., 1992).



**Figura 5** - Desenho didático ilustrando o coeficiente de absorção e penetração da Luz em função do seu comprimento de onda.

A absorção pode ser descrita através da Lei de Beer- Lambert ou Lei de Beer-Lambert-Bouguer (figura 6).



**Figura 6** – Esquema ilustrativo para explicação da Lei de Beer-Lambert

Onde  $z$  é a distância no meio,  $I_0$  intensidade incidente de luz na superfície,  $I(z)$  intensidade transmitida e  $\alpha$  é coeficiente de efetivo de atenuação do meio o qual dependerá do tipo de tecido (GROSSWEINER, 1997)

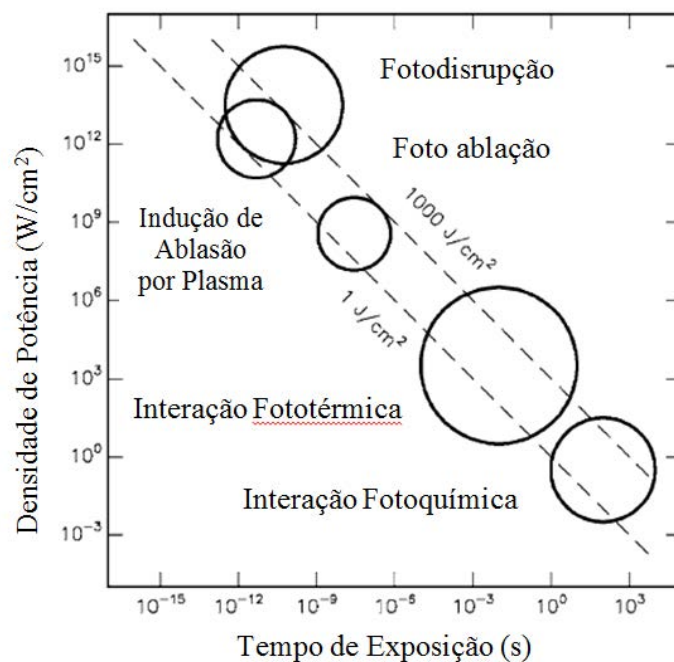
O processo de dispersão ou espalhamento pode ter caráter inelástico ou elástico, isso dependerá da parte da energia que o fóton incidente perde durante o processo. O espalhamento ou dispersão é a alteração da direção do fóton de luz incidente ao interagir com o tecido. Esse processo possui variação com o inverso do quadrado do comprimento de onda, logo em tecidos biológicos onde o comprimento de onda do fóton incidente é mais curto teremos maior intensidade de dispersão molecular(NIEMZ, 2007).

Estes processos de interação da energia do fóton de luz incidente com o tecido biológico podem resultar em efeitos; fotoquímico, fotofísico, fototérmico e fotomecânico dependendo das características específicas do tecido, comprimento de onda da luz, potência aplicada e tempo de exposição(OLSON; SCHIMMERLING; TOBIAS, 1981; KARU, T., 1989; LABBE et al., 1990; SMITH, 1991; LUBART et al., 1992; BREITBART et al., 1996; JORI et al., 1996; GROSSMAN et al., 1998; POLO et al., 1999).

Atualmente a indução destes efeitos com uso de LASER e LED de baixas intensidades são bem instituídos, reações primárias induzidas pela luz e reações secundárias que ocorrem na ausência de luz(KARU, T., 1999; SCHINDL et al., 2000).

As reações primárias podem promover efeitos biomoduladores, os quais podem promover bioestimulação ou bioinibição das atividades enzimáticas(KARU, T. et al., 1998).

As análises termodinâmicas sugerem que a interação da luz com proteínas intramembranares das células, como exemplo os cromóforos, podem gerar aquecimento local em decorrência da excitação molecular(PASCHER et al., 1996). Dependendo da duração da transmissão de energia, densidade de energia e propriedades ópticas do tecido, a transição dos efeitos térmicos terá efeitos diferentes sobre o tecido como: Hipertermia (42°C e 50°C), a qual promove mudanças conformacionais de moléculas que aumenta os processos de fluxo de nutrientes e ativa ou inativa as atividades bioquímicas, importantes para reações secundárias. Em temperatura superiores a 45°C o processo térmico pode ativar a proteína de choque térmico (HSPs) na tentativa de proteção e manutenção da célula. Temperaturas acima de 60°C podem promover desnaturação das moléculas inativando-as; vaporização a 100°C e a carbonização acima de 100°C (figura 7)(OLSON et al., 1981; NIEMZ, 2007).

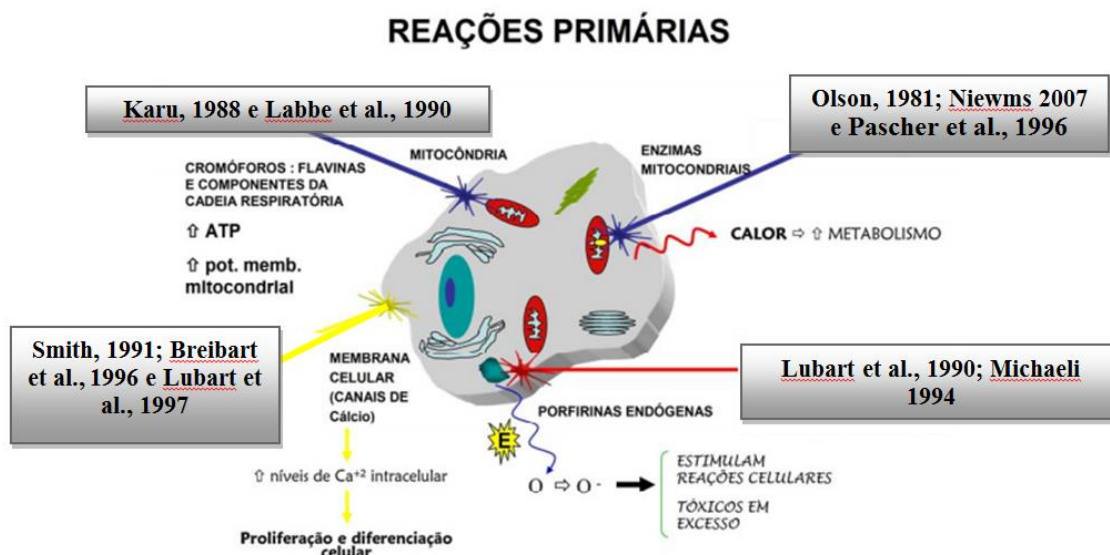


**Figura 7** - Interação Luz–Tecido. Os círculos apresentam uma estimativa grosseira dos parâmetros associados aos efeitos entre interação Luz-Tecido. Modificado por Boulnois 1986.

A interação da luz com fotorreceptores como, citocromo *c* e flavinas, na cadeia respiratória mitocondrial, provocam modificações nos potenciais de membrana mitocondrial promovendo mudanças fotodinâmicas em cadeias complexas que podem acelerar vias de síntese de ATP, NADP<sup>+</sup>, RNA, DNA, reações químicas e processos fisiológicos celulares, reações secundárias (figura 8 e 9) (KARU, T., 1999; 2008; KARU, T., 2010). As interações fotoquímicas ocorrem com densidades de energia muito baixas, com certos tipos de doses, comprimentos de onda e tempos de exposição (ROUNDS et al., 1984).

A ação da luz sobre a membrana celular pode alterar o potencial de ação por modificações fotofísicas aumentando o fluxo de entrada de Ca<sup>+</sup> e consequentemente a proliferação celular (SMITH, 1991; BREITBART et al., 1996; LUBART et al., 1997).

Vale destacar o interesse dos efeitos fotoquímicos na interação da luz com as porfirinas endógenas. Através da foto indução das porfirinas tem-se a formação de oxigênios singletos, estado quimicamente reativo do oxigênio, que promovem efeitos de oxidação em biomoléculas como lipídio, proteínas, aminoácidos, carboidratos e ácidos nucléicos (FEDOSEYEVA et al., 1984). O exemplo mais flagrante, na área médica, do efeito fotoquímico é a oxidação de fotossensibilizadores, o qual desempenha um papel expressivo durante terapia fotodinâmica (TFD).



**Figura 8** - Esquema das reações primárias foto induzidas na célula(MENEGUZZO, 2007)

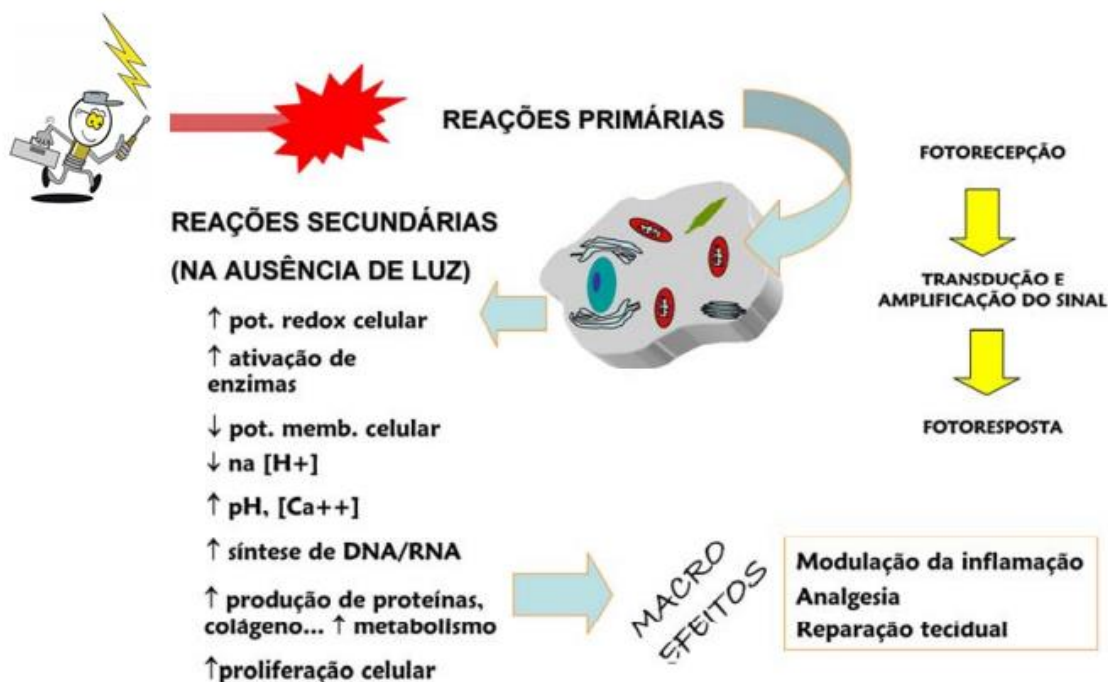
As respostas biológicas sem a presença da luz, conhecidas como reações secundárias, apresentam diversas sinalizações e amplificações das reações primárias. A mudança do estado redox das cadeias respiratórias, em decorrência da absorção pelos fotorreceptores, está diretamente ligado na homeostasia celular(KARU, T., 1996).

A oxidação de ATP e NADH, oriundos da reação primária, pela ativação das ATPases leva a alterações do pH. A acidificação do citoplasma desregula a atividade da enzima que controla a alcalinidade da célula acarretando, por breve momento, o aumento intracelular de  $Ca^{+2}$  que estimula o metabolismo celular. Se o processo for de redução do  $Ca^{+2}$  intracelular tem-se a inibição do metabolismo celular(KARU, T. et al., 1998).

Estudos demonstraram que mesmo níveis altos de  $Ca^{+2}$  intracelular podem levar a inibição do metabolismo celular em decorrência da dose aplicada e comprimento de onda utilizado na irradiação(FRIEDMANN; LUBART, 1996; KARU, T., 1996).

As mudanças conformacionais na ultraestrutura mitocondrial pela ação térmica demonstraram um aumento na geração de energia e consequentemente a intensificação do metabolismo celular(BAKEEVA et al., 1993).

Artigos na literatura confirmam a existência dos mecanismos secundários ou das reações secundárias aos processos de bioestimulação e bioinibição, já enfatizados no tópico de Fototerapia, da luz sobre os tecidos biológicos(KARU, T., 1987;1999).



**Figura 9** - Mecanismo das Reações secundarias a partir do estímulo por Fototerapia(MENEGUZZO, 2007)

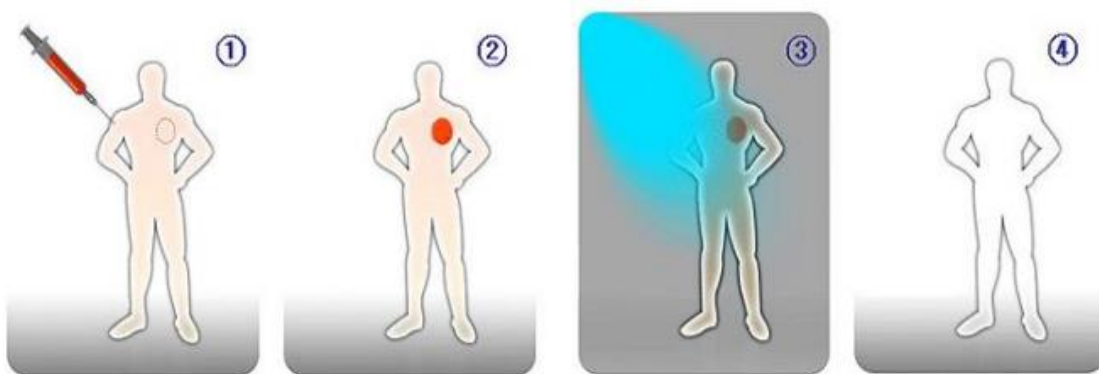
## 1.7 TERAPIA FOTODINÂMICA

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma técnica terapêutica que combina um conjunto de processos químicos; fármacos fotossensíveis ou fotossensibilizadores (FS); físicos: irradiação com luz (coerente ou incoerente) e biológico: presença do oxigênio molecular, normalmente presente na célula alvo.

As primeiras aplicações experimentais da terapia fotodinâmica datam de 1888 em artigo publicado por Marcacci, não obstante, os dados apresentado eram insuficientes para análise. Somente em 1900 Oscar Raab e Von Tappeiner observaram os efeitos citotóxicos causado pelo corante acridina sobre culturas de paramécios submetidas a luz(ACKROYD et al., 2001). Em 1903, Niels Finsen realizou a primeira aplicação clinica contra a manifestações de tuberculose cutânea utilizando eosina e luz vermelha, obtendo, também, sucesso no tratamento da varíola, sífilis, psoríases e câncer de pele(ACKROYD et al., 2001; ALLISON et al., 2004). Contudo, somente na década de 70 ganhou um impulso como terapia, após os experimentos de Dougherty com câncer(HENDERSON; DOUGHERTY, 1992; DOUGHERTY, THOMAS J et al., 1998; SIBATA et al., 2000). Nas últimas décadas muitos avanços nas explorações

clínicas e descoberta de novos FS para o uso da terapia fotodinâmica, com diversas finalidades(AMORIN, 2007)

Os mecanismos de interação para foto destruição da célula alvo requerem a presença de três fatores que interagem concomitantemente: o fotossensibilizador, a fonte emissora de luz e o oxigênio molecular. Vale ressaltar que a ação isolada da luz, em certas doses e intensidade, ou do fotossensibilizador, em certas concentrações, não promoverá o efeito deletério ao tecido alvo(figura 10)(DOUGHERTY, T. J., 1987).



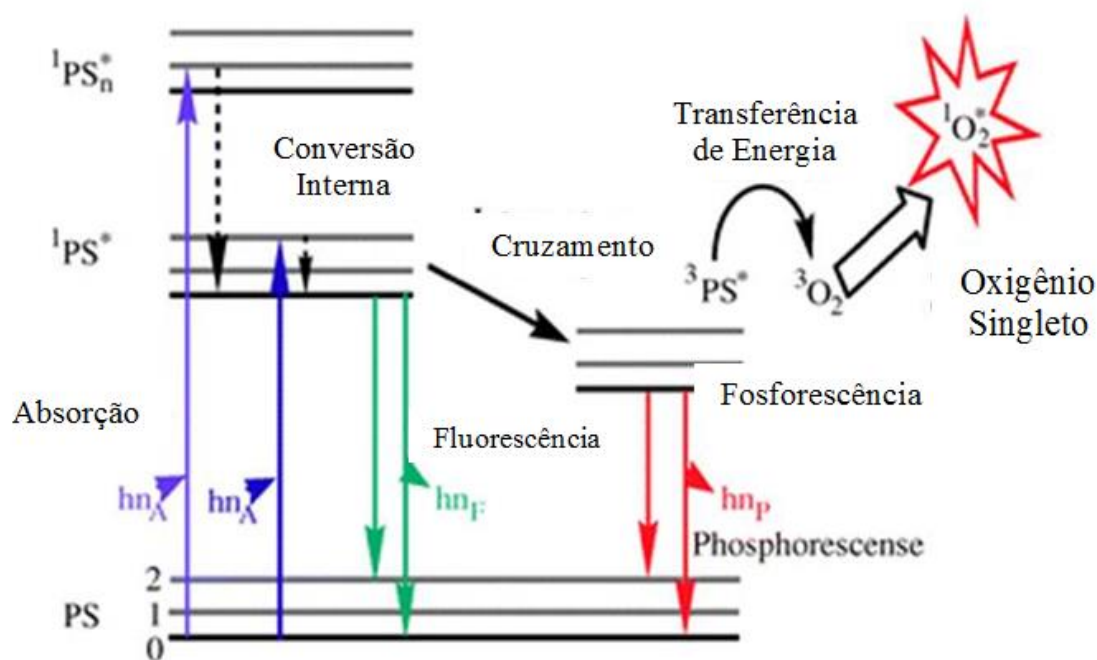
**Figura 10** - Princípio Básico da Terapia Fotodinâmica(DOUGHERTY, THOMAS J et al., 1998)

Os processos de interação dos fotoquímicos na FTD consistem em dois mecanismos distintos: Mecanismo tipo I e Mecanismo tipo II(MELLO et al., 2001; ALLISON et al., 2004).

No mecanismo tipo I, o fotossensibilizador em estado excitado, interage com os átomos de hidrogênio da molécula (proteínas, colesterol, etc) removendo-os ou transferindo elétrons, gerando radicais livres os quais tendem a reagir com oxigênio resultando em espécies reativas de oxigênio, como: Peróxido de hidrogênio, íons hidroxila, ânion superóxidos entre outros, que podem oxidar diversas biomoléculas(CHATTERJEE et al., 1997; MENEZES, 2001).

No mecanismo tipo II, a absorção da luz pelo fotossensibilizador promove a mudança do seu estado fundamental para uma estado tripleto (estado excitado). A transferência da energia excedente do fotossensibilizador para o oxigênio molecular no estado fundamental (Estado tripleto) gera o oxigênio singleto, forma reativa do oxigênio, o qual pode interagir com proteínas, aminoácidos, lipídeos, constituintes da membrana celular, ácidos nucleicos, promovendo reações fotoxidativas que cominam na morte celular(figura 11)(MENEZES, 2001; CORREIA, 2006).





**Figura 11** – Diagrama de Jablonski demonstrando a geração do Oxigênio singleto, fluorescência, absorção, fosforescência <http://photochemistryportal.net/home/index.php/category/light-absorption> - acessado em 02/01/2014.

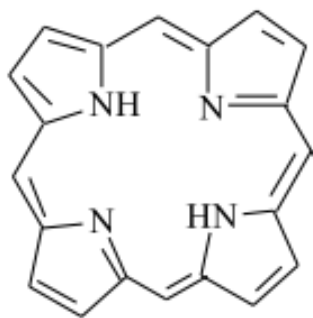
## 1.8 FOTOSSENSIBILIZADORES

A busca por novos fotossensibilizadores com alto grau de geração do estado singleto e taxa de transferência de energia mais longa, melhor sinergismo com diferentes tipos celulares, menor citotoxicidade, tempo de incubação e adequações físicas da luz, rendimento quântico, comprimento de onda, dose, tempo de exposição são essenciais para a eficácia e continuação do uso da Terapia fotodinâmica.

### 1.8.1 Porfirinas

As porfirinas formam uma enorme classe de moléculas orgânicas derivadas de compostos macrocíclos tetrapirrólicos presentes em diversos sistemas biológicos (figura 12)(WHITE; HANDLER; SMITH, 1964). A propriedade das porfirinas e seus derivados em formar complexos com íons metálicos (metaloporfirinas) exercem funções vitais no metabolismo celular como: responsáveis pela ligação e transporte de oxigênio, na transferência de elétrons das reações de oxidação-redução e ativação de enzimas de catalase(BONNETT et al., 1990; MIRONOV; NIZHNIK; NOCKEL, 1990).

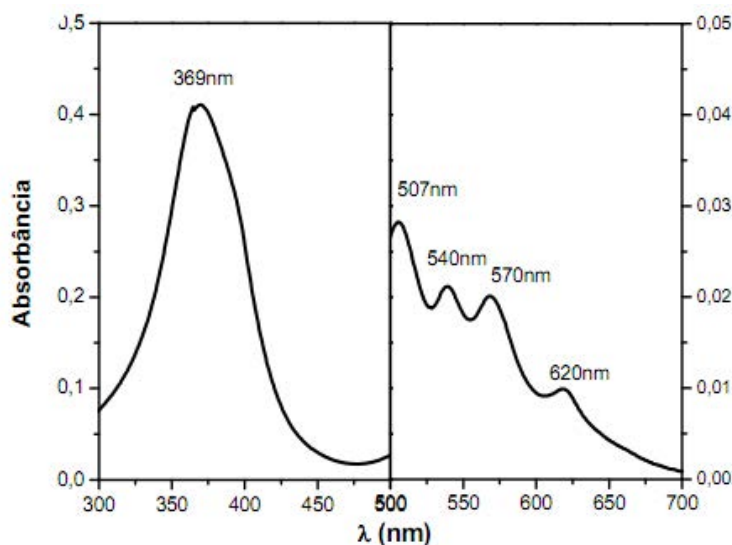




**Figura 12** – Fórmula estrutural comum das Porfirinas(DU et al., 2003).

Os compostos derivados da hematoporfirina (do inglês, *hemtoporphyrin derivate*, ou HpD), com destaque para os; Photofrin<sup>®</sup>, Photosan<sup>®</sup> e Photogem<sup>®</sup>, são considerados FSs de primeira geração e tem demonstrado grande eficácia na FTP principalmente no controle microbiológico de fungos(BAGNATO, V.S., 2008).

Estes HpDs apresentam espectros de absorção eletrônica bem definidos, sendo a banda mais intensa na região de 370nm, chamada de banda de Soret e outras quatro bandas entre 500 e 635nm, chamadas de bandas Q (Figura 13)(DOUGHERTY, T. J., 1987).



**Figura 13** – Espectro de absorção do Photogem<sup>®</sup>.

O fotossensibilizador empregado neste trabalho foi o Photogem<sup>®</sup> procedente do Instituto de Alta Tecnologia em Química de Moscou, Rússia e aprovado para uso médico pelo comitê de Farmacologia da Rússia desde 1999, cedido pelo Prof. Dr. Vanderlei S. Bagnato (IFSC-USP), coordenador do Centro de Pesquisa, Inovação e Difusão de Ótica e Fotônica (CEPOF).

## **1.9 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA**

### **1.9.1 Aplicações dos mAbs**

As possibilidades terapêuticas com o uso dos mAbs tem aumentado nos últimos anos. Atualmente o emprego no tratamento de canceres, doenças auto imunes, alergias, entre outros se torna cada vez mais comum na medicina moderna(RITA COSTA et al., 2010; SHUKLA; THOMMES, 2010).

O rápido desenvolvimento da indústria de biotecnologia impulsionam processos com alto rendimento, avanços na melhora da biodisponibilidade, especificidade de ligação e redução dos efeitos colaterais como no desenvolvimento da tecnologia de humanização dos mAbs(SHUKLA; THOMMES, 2010).

Como decorência do mercado dinâmico, fabricantes e fornecedores da indústria de biotecnologia exploram novas maneiras de aperfeiçoar a produção dos mAbs. Entre as medidas adotadas estão a diminuição do número de etapas, redução dos custos com matérias primas e pesquisas de métodos alternativos para recuperação e purificação de proteínas(LOW; O'LEARY; PUJAR, 2007).

Melhorias na eficiência do processo produtivo, com o desenvolvimento de linhagens de células com alta produtividade e especificidade, intensificam a busca por seleção celular em combinação com alto rendimento em intervalo de tempo(SOMMERFELD; STRUBE, 2005; FARID, 2007; CHON; ZARBIS-PAPASTOITSIS, 2011).

Diante destas circunstâncias, a tecnologias envolvendo o potencial bioinibidor do LED de baixa potência surge de forma oportuna na tentativa de selecionar células de mielomas NS1 e Híbridos e substituir o processo do uso do meio HAT.

## *Objetivos*

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Geral

- Avaliar a possibilidade da Fotoseleção por meio da irradiação com LED em culturas de Mielomas (NS1) e Híbridomas *in vitro*.

### 2.2 Específicos

- Comparar as taxas de viabilidades para o Mielomas NS1 e Híbridomas *in vitro* submetidos a Irradiação com LED nas doses 1,0; 3,0 ; 5,0; 10; 20J/cm<sup>2</sup> no comprimento de onda de 475nm ± 20nm.
- Avaliar as taxas de viabilidades das células através de Citometria de Fluxo e MTT (3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide).
- Estabelecer índice de apoptose e necrose das células por Citometria de Fluxo.
- Estabelecer crescimento celular com Hemocitometro.

## *Material e Método*

### 3.MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi desenvolvido com a parceria de duas instituições: o Centro de Pesquisa em Óptica e Fotônica (CEPOF) da Universidade de São Paulo (USP), câmpus de São Carlos, com a participação do Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato e da Dra. Natália M. Inada, que forneceram as validadas “Bio Table”. A outra instituição envolvida foi a Universidade Estadual Paulista –Júlio de Mesquita Filho (UNESP), câmpus de Botucatu. Os trabalhos foram desenvolvidos no Laboratório de Engenharia Celular(LEC) do Hemocentro do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina.

Na etapa da cultura celular distinguem-se as diferentes linhagens utilizadas: o mieloma múltiplo murino, denominado NS1, provenientes de acordo internacional com o *Laboratoire de Genie D’Institute National de Transfusion Sangüine* (INTS) de Paris, integrante da *Agence Française du Sang*, célula esta, imprescindível para todo protocolo clássico de produção de anticorpos monoclonais(DEFUNE et al., 1992). Duas outras linhagens, ou clones, foram utilizados: clones secretores de anticorpos monoclonais anti-PBp2a, cuja especificidade é dirigida contra uma proteína de membrana da bactéria *Staphylococcus aureus* multi-resistente. Estes clones receberam a denominação de MRSA e seguindo padronização internacional, os números diferenciam os clones entre si. Estes clones são oriundos de pesquisa prévia, registrada no comitê de ética da FMB (protocolo CEEA 976-2012) mantidas em nitrogênio líquido(QUERINO, 2013) e desenvolvidas no LEC.

#### 3.1Cultura Celular

Os três tipos celulares utilizados: NS1, MRSA4-27 e MRSA3-75 integrantes do banco de células do LEC, mantidos congelados em nitrogênio líquido a -196°C, foram descongelados segundo protocolo operacional padrão do Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro de Botucatu e aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP (Anexo 1). A metodologia de aplicação do LED nas culturas *in vitro* seguiram as normas de segurança de acordo com a resolução da ANVISA RDC nº 185/01.

#### 3.2 Produção de hibridoma anti-MRSA

Os hibridomas foram produzidos pelo método convencional Köhler & Milstein (1975) com modificações de Deffune (1992). Resumidamente, seis fêmeas BALB / c (8 semanas de idade), foram imunizadas com 40mg/kg do antígeno obtido segundo Blanco

1995 emulsionado 1:1 com adjuvante Sulfato de alumínio e potássio dodecahidratado  $KAl(SO_4)_2 \cdot 12 H_2O$  (BLANCO et al., 1995).

Nos dias 0 e 15, os animais foram imunizados via intraperitoneal. No dia 30 receberam apenas antígeno sem adjuvante via endovenosa. A concentração do antígeno foi a mesma em todos os procedimentos. No dia 32 realizou-se coleta de sangue para ensaio ELISA para detecção de anticorpos específicos, todos os animais apresentaram alta reatividade. No dia 33 os baços de cada camundongo foram removidos para coleta dos linfócitos B e posterior fusão com Mieloma Murino.

Os sobrenadantes dos Hibridomas resultantes foram testados por ELISA e clonados por diluição limitante, para selecionar células únicas secretoras de anticorpos monoclonais específicos.

### **3.3 Protocolo ELISA indireto**

O protocolo ELISA indireto foi empregado para determinar a presença de anticorpos específicos contra os antígenos utilizados na imunização dos camundongos. O antígeno anti-MRSA foi fixado em microplacas de fundo chato na concentração de 25 µg/mL em tampão carbonato-bicarbonato ( $Na_2CO_3/ NaHCO_3$  0,2M, pH 9,6) por 1 hora a 37°C e, em seguida, a 4°C por 12 horas. O bloqueio das reações inespecíficas foi realizado com blotto (PBS (0,14 M NaCl; 1,4 mM  $KH_2PO_4$ ; 8mM  $Na_2HPO_4$ ; 2,7 mM KCl - pH 7.4 + 5% de leite em pó desnatado). Os sobrenadantes das células (100 µL) foram aplicados nas placas sensibilizadas. Como controle positivo foram empregados soros dos camundongos imunizados e meio de cultura RPMI 1640 livre de fenol estéril e soro de camundongo não imunizado como controles negativos. O anticorpo secundário escolhido para detectar os anticorpos murinos foi IgG de cabra polivalente anti-IgG/ IgM/ IgA de camundongo (1/10.000) (Sigma®) conjugado a peroxidase, diluídos em uma solução de leite desnatado denominada. A solução cromógena empregada foi o TMB (3,3',5,5'- tetrametilbenzidina, Abbot®). A medida da intensidade da reação foi realizada por análise espectrofotométrica em aparelho leitor de microplacas, com filtro de 450nm. Entre as etapas foram realizadas lavagens com PBS pH 7.4 (0,14 M NaCl, 1,4 mM  $KH_2PO_4$ , 8 mM  $Na_2HPO_4$ , 2,7 mM KCl) adicionado de 0,1% Tween 20.

Os dois hibridomas (MRSA 3-75 e MRSA 4-27) foram selecionados por apresentarem características secretoras inferiores ao desejado com reatividades baixa e média, respectivamente, de acordo com a Densidade Óptica (DO) ao teste ELISA. A

DO permite classificar as células quanto à reatividade em: baixa (DO inferior a 3x a DO controle negativo), média ( $3x < DO < 10x$  da DO controle negativo) e alta reatividade ( $DO > 10x$  controle negativo).

Em suma, os sobrenadantes de cultura foram testados em cada etapa da pesquisa para confirmação da especificidade, estabilidade e quantificação da produção de anticorpos. Para assegurar manutenção de suas características secretoras e especificidade dos sobrenadantes os monoclonais selecionados foram testados antes do início dos protocolos com luz.

### **3.4 Descongelamento**

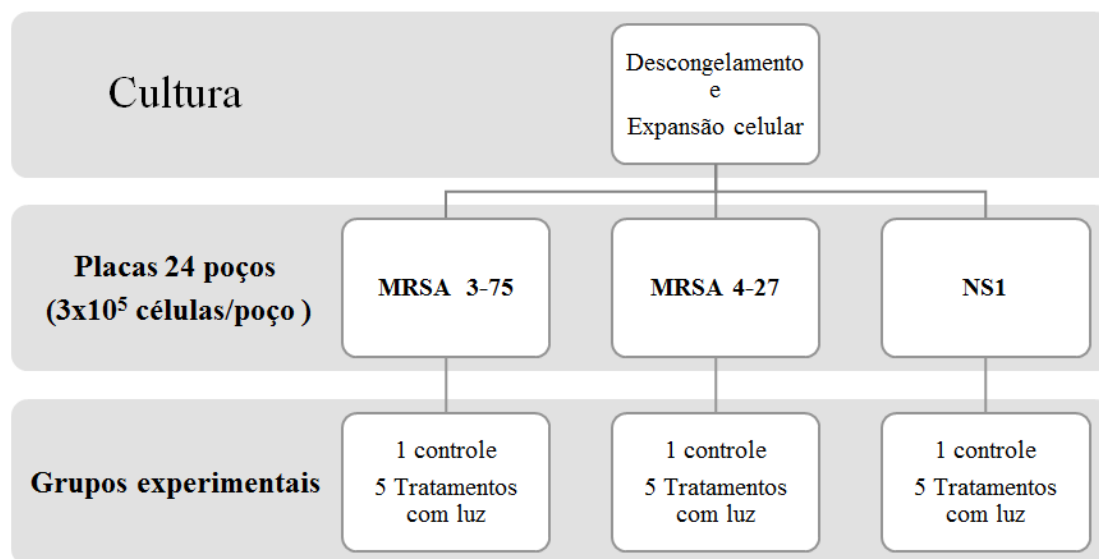
As células de Hibridomas e NS1 foram descongeladas 10 dias antes do início dos protocolos com luz, segundo Deffune (1992) e mantidas em crescimento em frascos de 25 cm<sup>2</sup> de poliestireno, para cultura de células em suspensão, com meio de cultura RPMI 1640 livre de fenol acrescido de soro fetal bovino 10%, aminoácidos essenciais e não essenciais, glicose, insulina e antibióticos e mantidas em estufa a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

### **3.5 Cultivo Celular**

Após o descongelamento, acompanhou-se o crescimento das células por avaliação em microscopia invertida até atingir viabilidade celular igual ou superior a 90%, verificada por coloração azul de tripano (*Tripan Blue* 0,4%). Realizou-se quando necessário a fotodocumentação com auxílio de Câmera fotográfica Canon *Power shot* 620 A acoplada a microscópio Zeiss ® Axiovert 200.

Cada tipo celular foi acondicionado em seis placas de cultura de 24 poços (Greiner bio-one®, suspension-culture plate) com volume de  $3 \times 10^5$  células/poço com volume final de 2 ml/poço, segundo protocolos de irradiação (Figura 14). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.





**Figura 14.** Fluxograma experimental

Após 24 horas do plaqueamento (dia 1) as células foram expostas à irradiação todos os dias, exceto o grupo controle de cada tipo celular que não foi exposto à irradiação em nenhum momento.. Decorridas 24 horas da exposição à luz, metade do conteúdo de cada poço (1ml) foi removido para às análises de citometria de fluxo, MTT e quantificação. Em seguida acrescentou-se 1ml de meio cultura em cada poço com retorno d placa à estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> e mantida por 8 horas antes da exposição diária. As placas foram observadas diariamente por microscopia invertida (Zeiss ® Axiovert 200) com obtenção de imagens da evolução antes de receberem tratamento pela luz.

Com o intuito de minimizar quaisquer alterações na atividade mitocondrial não relacionada com a luz todos os protocolos empregados neste trabalho foram realizados com meio de cultura livre de fenol. Isto é devido à possibilidade da interação da luz com constituintes do meio extracelular in vitro, especialmente vermelho fenol promovendo redução da atividade mitocondrial(ROTENBERG et al., 2006).

### 3.6 Protocolo de Irradiação das Células

As culturas celulares foram irradiadas com auxílio da mesa difusora –Bio Table”, constituídas por LEDs no comprimento de onda de 475nm ± 20 nm com potência de 35 mW/cm<sup>2</sup> e emissão contínua, desenvolvida pelo centro de pesquisa em Óptica e Fotônica (CEPOF) do Instituto de Física de São Carlos (IFSC) da Universidade de São Paulo (USP) (figura 15).

Para cuidados prévios à irradiação o equipamento foi calibrado usando-se sistema duplo de monitoramento: medidor de potência Coherent (modelo FM) e detector de intensidade Coherent VIS X461.



**Figura 15:** "Bio Table" acionada com  $\lambda$  475nm  $\pm$  20 nm com potência de 35 mW/cm<sup>2</sup> com emissão contínua.

As células foram irradiadas com doses 1,0; 3,0; 5,0; 10 e 20J/cm<sup>2</sup> com os seus respectivos tempos de exposição (tabela 3) dentro de capela de fluxo laminar, preservando a esterilidade da cultura, para avaliar o crescimento e viabilidade celular. As placas referentes aos grupos controles foram irradiadas e mantidas por 180 segundos em fluxo laminar para promover o stress de manipulação da cultura.

Os tempos de exposição foram calculados através da expressão:

$$T = \frac{\text{Dose (J/cm}^2\text{)}}{\text{Densidade de Potência (W/cm}^2\text{)}}$$

| Dose (J/cm <sup>2</sup> ) | Controle | 1,0 | 3,0 | 5,0 | 10,0 | 20,0 |
|---------------------------|----------|-----|-----|-----|------|------|
| Tempo de Exposição (s)    | 0        | 29  | 86  | 143 | 286  | 572  |

**Tabela 3** – Tempo de exposição por dose

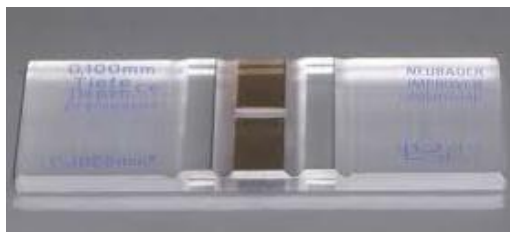
### 3.7 Determinação Das Viabilidades Celulares

#### 3.7.1 Coloração: *Trypan Blue* (STROBER, 2001).

O teste de exclusão com corante *Trypan Blue* foi empregado para determinar o número de células presente em cada grupo experimental. As células foram coradas 24 horas após exposição à luz. O ensaio avalia a integridade das membranas celulares, sendo que as células intactas excluem o corante mantendo seu citoplasma claro, enquanto as células mortas permitem a passagem do corante para seu interior apresentando citoplasma azul.

De maneira sucinta, os poços de cultura foram homogeneizados e 1 ml da solução foi transferida para tubos de hemólise e centrifugados a 1200rpm por 10 minutos. Em seguida o sobrenadante foi descartado e acrescido 1 ml de PBS as células, para evitar colorações inespecíficas em especial proteínas meio de cultura.

Volumes iguais (30µl) de tripan blue (0,4% Invitrogen®) e células foram incubadas por 3 minutos em temperatura ambiente e posterior contadas em hemocitômetro (Câmara de Neubauer) (figura 16).



**Figura 16** - Foto Hemocitômetro

As contagens foram realizadas por dois examinadores que não tinham conhecimento sobre qual grupo pertencia às amostras celulares. Para o cálculo do número de células em cada amostra utilizou-se:

$$N^{\circ} \text{ de Células} = \frac{N^{\circ} \text{ Total de células} * \text{Fator de diluição} * 10^4}{N^{\circ} \text{ s de Quadrantes Contados}}$$

#### 3.7.2 Determinação da Viabilidade por MTT

A viabilidade celular foi avaliada pelo teste de ensaio colorimétrico MTT. O teste é baseado na conversão do MTT (3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium

bromide) em cristais de formazan pelas células viáveis, em decorrência da atividade mitocondrial. O teste foi utilizado para avaliação da viabilidade celular. As células foram incubadas (placas de 96 poços) a  $1 \times 10^5$ /ml por 120 minutos a 37°C em 5% CO<sub>2</sub>. Em seguida centrifugadas a 1200rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, mantendo o *pellet* celular que recebeu 15µL de solução MTT (2,5 mg/mL) e 135µL meio RPMI com 10% de SFB. As placas foram homogeneizadas em agitador por 5 minutos e incubadas por 4 horas a 37°C a 5% CO<sub>2</sub>. Após o sobrenadante foi aspirado e acrescido 200µL de DMSO/poço, homogeneizadas e realizado em triplicata as leituras das densidades ópticas por espectrofotômetro (Labsystems Multiskan MS) com comprimento de onda de 550nm, (MOSMANN, 1983).

### **3.7.3 Determinação dos índices de apoptose e necrose por Citometria de Fluxo no mesmo intervalo de tempo**

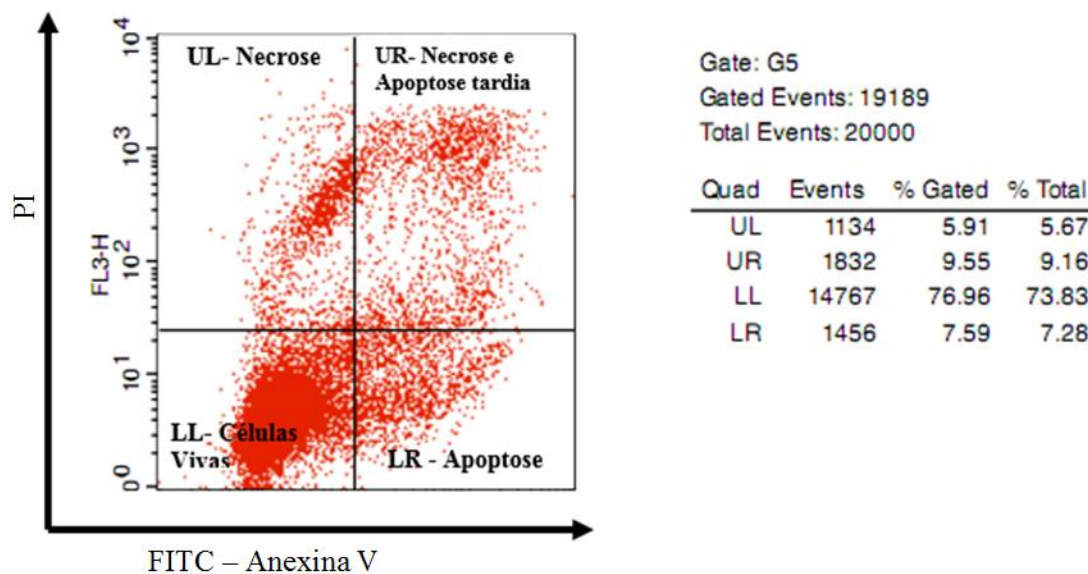
Para esta etapa foram empregados reagentes de determinação de apoptose e necrose pela metodologia de citometria de fluxo Anexina V (KIT –ANNEXIN V-FITC APOPTOSIS DETECTION KIT I” - BD Pharmingen™) e iodeto de propídeo. A marcação das células foi realizada segundo especificações do fabricante, leitura por citometria de fluxo FACSCALIBUR BD® e a análise em software PAINT-A-GATE da BD®. A anexina V é uma proteína Ca<sup>2+</sup> dependente que tem elevada afinidade por fosfatidilserinas. As fosfatidil-serinas são fosfolípidos internos da membrana que só são expressos nos casos de apoptose. O iodeto de propídeo é utilizado para diferenciar células intactas das não intactas. As células intactas excluem o IP enquanto que as células mortas são permeáveis ao produto.

Na avaliação por Citometria de Fluxo classificamos as células em:

- expressão negativa de anexina-V e PI = células viáveis;
- expressão positiva de anexina-V e negativa de PI = células nos estágios precoces de apoptose;
- expressão positiva de PI e negativa de anexina-V = morte celular por necrose, autofagia ou lise celular;
- expressão positiva de anexina-V e PI = células nos estágios finais de apoptose.

### 3.7.3.1 Análise de Dispersão Celular

As análises por Citometria de fluxo são realizadas para o estudo das populações celulares segundo tamanho da célula, granulosidade e fluorescência emitida das amostras, distribuídas em quadrantes (figura 17).



**Figura 17** – Representação da análise de dispersão de célula marcada com Anexina V e PI

As análise deste estudo seguiu o padrão ilustrado da figura 17 para todos os tipos de células usadas em cada momento expresso em porcentagem de células por quadrante.

### 3.8 Dosagem de Proteínas

A determinação de proteínas totais será realizada nos sobrenadantes de cultura coletados a cada 24 horas após a irradiação imediatamente antes da troca do meio de cultura em espectrofotômetro (Nanodrop 1000®) de acordo com instruções do fabricante. Os resultados foram normalizados levando em consideração a quantidade proteica pré-existente no meio de cultura.

### 3.9 Mensuração da Temperatura

A cultura temperatura foi medida em triplicata imediatamente após a exposição à luz para os grupos irradiados e do grupo controle utilizando termômetro de infravermelho modelo ICEL TD-971.

### **3.10 Estatística**

A análise estatística foi realizada com os softwares BioEstat 5.3 e SPSS 12.0 *for windows* para análise da variância será de acordo com normalidade e homocedasticidade (variância Homogênea). Para análise de variância paramétrica foi utilizado o teste Anova seguida de teste de Tukey. Os dados não paramétricos sofreram análises por Kruskal - Wallis seguido de teste de Dunn entre o grupo controle e os grupos irradiados (ZAR, 1974).

## *Resultados e Discussão*

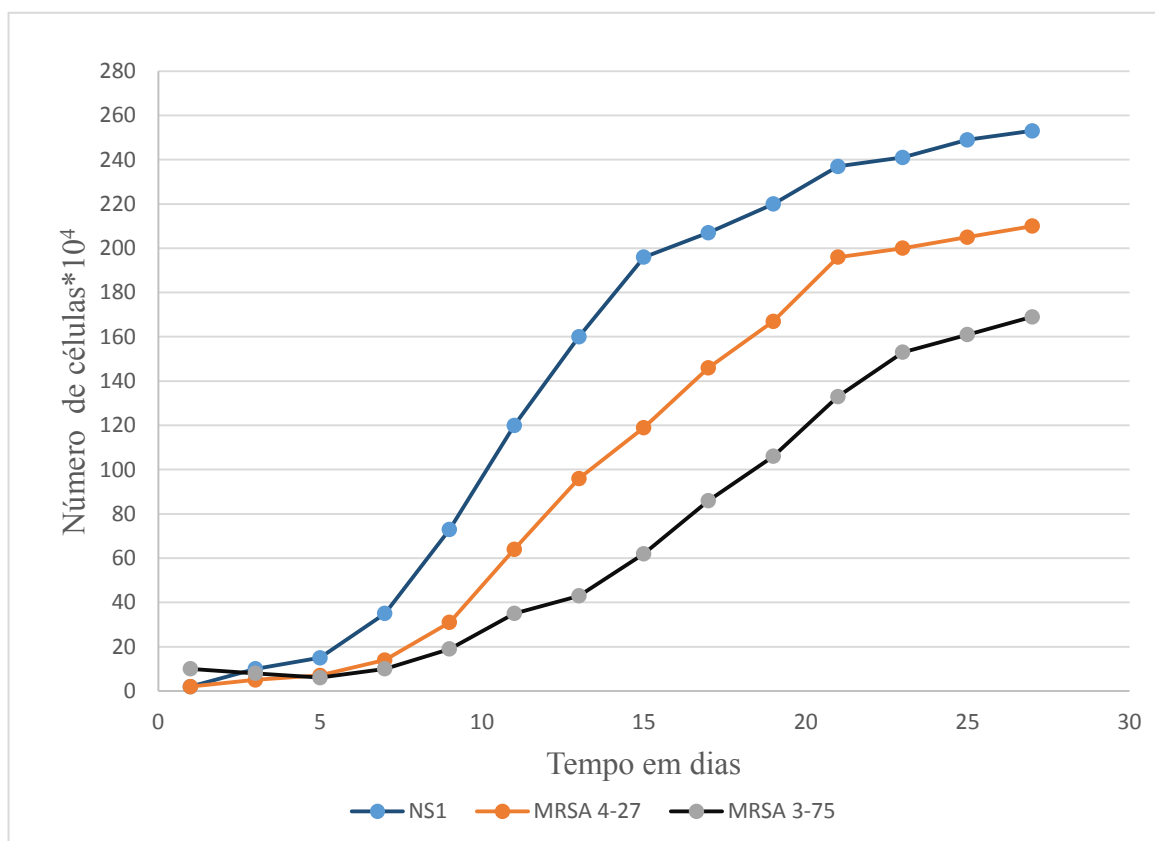
#### 4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após o descongelamento e amplificação das três linhagens, que em média durou 28 dias, foram processadas as contagens celulares das mesmas para determinar a concentração padrão e a partir de então procedeu-se a alíquota de  $3 \times 10^5$  células semeadas igualmente em 6 poços de cultura, cada 2 poços para um tipo celular, nas placas de 6 poços. A área de crescimento correspondendo  $9,6 \text{ cm}^2$  portanto a uma média de  $3.957 \text{ células/cm}^2$ .

Durante os processos de congelamento/descongelamento e expansão em cultura os híbridomas podem perder sua reatividade, apresentarem baixa taxa de crescimento, alterações morfológicas que comprometam a função secretora ou contaminação da cultura (DEFFUNE et al., 1992). Diante do exposto, as células dos clones secretores de anticorpos monoclonais (híbridomas) foram cultivadas durante 28 dias e os sobrenadantes de cultura foram testados nos dias 15, 21 e 28 para confirmação das densidade ópticas (DO) por teste Elisa antes do início dos protocolos de irradiação. Desta forma, além dos testes anteriormente realizados por Querino et al 2012, a função secretora da célula recém descongelada foi comprovada. Após confirmação da reatividade os híbridomas e crescimento uniforme das células ao atingirem viabilidade superior a 90% foram transferidas para placas de cultura de 24 poços a  $3 \times 10^5$ /poço. A cultura do NS1 foi conduzida analisando-se por microscopia invertida o aspecto morfológico e a taxa de crescimento até atingir a curva exponencial de crescimento conforme gráfico 1.



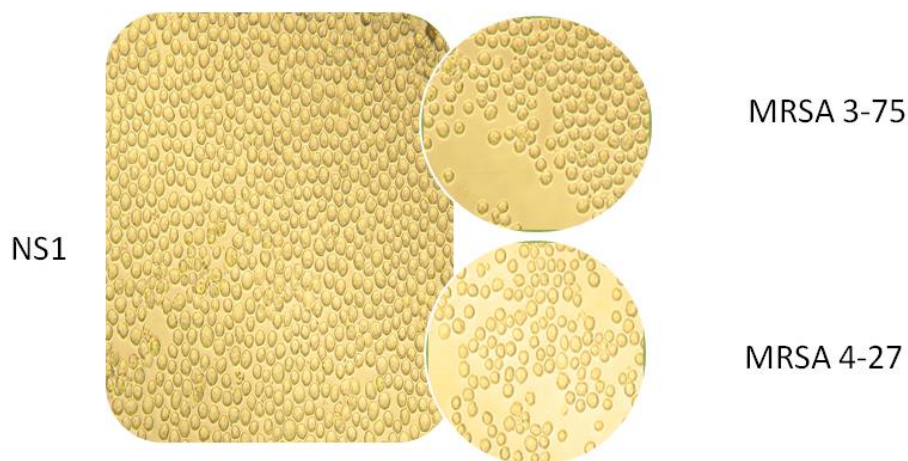
## Curva de Crescimento Padrão



**Gráfico 1** – Curva de crescimento do mieloma murino (NS1) e dos hibridomas (MRSA 4-27 e MRSA 3-75) ao longo de 28 dias de cultura

A partir do 7º dia de cultura, o aspecto morfológico das células do NS1 era homogêneo e a curva de crescimento mostra um desdobramento a cada 48 h, atingindo um *plateaux* ao redor do 20º dia. A análise do crescimento dos dois clones MRSA são bem distintas daquela observada no NS1 (vide gráfico abaixo). Estes hibridomas atingem uma fase de crescimento expressivo a partir do 13º 14º dia de cultura, necessitando portanto da observação inicial durante 28 dias de cultura antes de lançar o experimento propriamente dito sob a ação da luz.

A fotodocumentação das células foram registradas em microscópio invertido Zeiss® (figura 18).



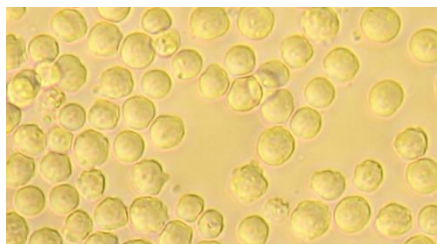
**Figura 18** - Fotodocumentação das três linhagens celulares estudadas: Mieloma Murino, MRSA 3-75 e MRSA 4-27.

Com o intuito de aperfeiçoar a produção de anticorpos monoclonais otimizando a produção de hibridomas que secretam anticorpos de interesse, mas o processo de sintetização celular é mais ameno, e pode comprometer o processo *scale up*, dois hibridomas com DO inferior ao desejado foram selecionados MRSA 3-75 ( $DO \leq 0,221$ ) e MRSA 4-27 ( $DO \leq 0,37$ ) para os protocolos de irradiação. As curvas de crescimento destes hibridomas, como pode ser observado acima, são mais lentas acarretando maiores custos de produção com insumos (meio de cultura, aminoácidos, soro fetal bovino, etc) além de expor a metodologia a maior risco de contaminação pela exigência de cultura em longo tempo.

Quanto aos aspectos morfológicos das células, os grupos experimentais foram observados diariamente por microscopia invertida para avaliação e registro fotográfico nos dias 1, 3, 5, 7, 9 e 10.

#### 4.1 Morfologia

A metodologia de cultivo envolve as técnicas específicas para células em suspensão que evidencia em condições ótimas, células não aderentes, redondas, membranas lisas, dispersas no meio de cultura sem formação de aglomerados Deffune, 1992 como —pólas dispersas em meio líquido”(figura 19)



**Figura 19-** Cultura celular

No entanto, foram observadas alterações morfológicas das mesmas ao longo da exposição à luz. As primeiras mudanças celulares para as três linhagens foram registradas 48 horas após a luz nas doses de 1,3, 5, 10, e 20J/cm<sup>2</sup>.

A figuras 20, 21 e 22 registram documentações fotográficas do NS1, MRSA 4-27 e MRSA 3-75 tanto para os poços controle (não irradiados) como para aqueles irradiados nas diferentes doses e para os momentos de 24, 72 e 120 horas após a primeira exposição.

Observa-se na figura 20 - A, da esquerda para a direita, momento de 24 horas os registros fotográficos do NS1 com diferenças morfológicas. As células irradiadas com 1 J/cm<sup>2</sup> tiveram bioestimulação acentuada em relação ao grupo controle e presença de conglomerados celulares, que consiste no mecanismo de adequação do estado homeostático desregulado pelo estresse em cultura. Na dose de 3 e 5 J/cm<sup>2</sup> são observadas alterações morfológicas similares a dose de 1J/cm<sup>2</sup> além irregularidades na membrana celular.

A análise morfológica das doses de 10 e 20 J/cm<sup>2</sup> mostram irregularidade da membrana celular, presença de células vacuolizadas, grandes, conteúdo citoplasmático danificado, caracterizando o processo de necrose celular. (ZIEGLER; GROSCURTH, 2004).

Na figura 20 - B, da esquerda para a direita. Observa-se que o grupo controle continua com seu aspecto perolado, as células expostas à luz de 1 J/cm<sup>2</sup> continua com seu efeito bioestimulador sem sinais de dano morfológico, mas com presença de

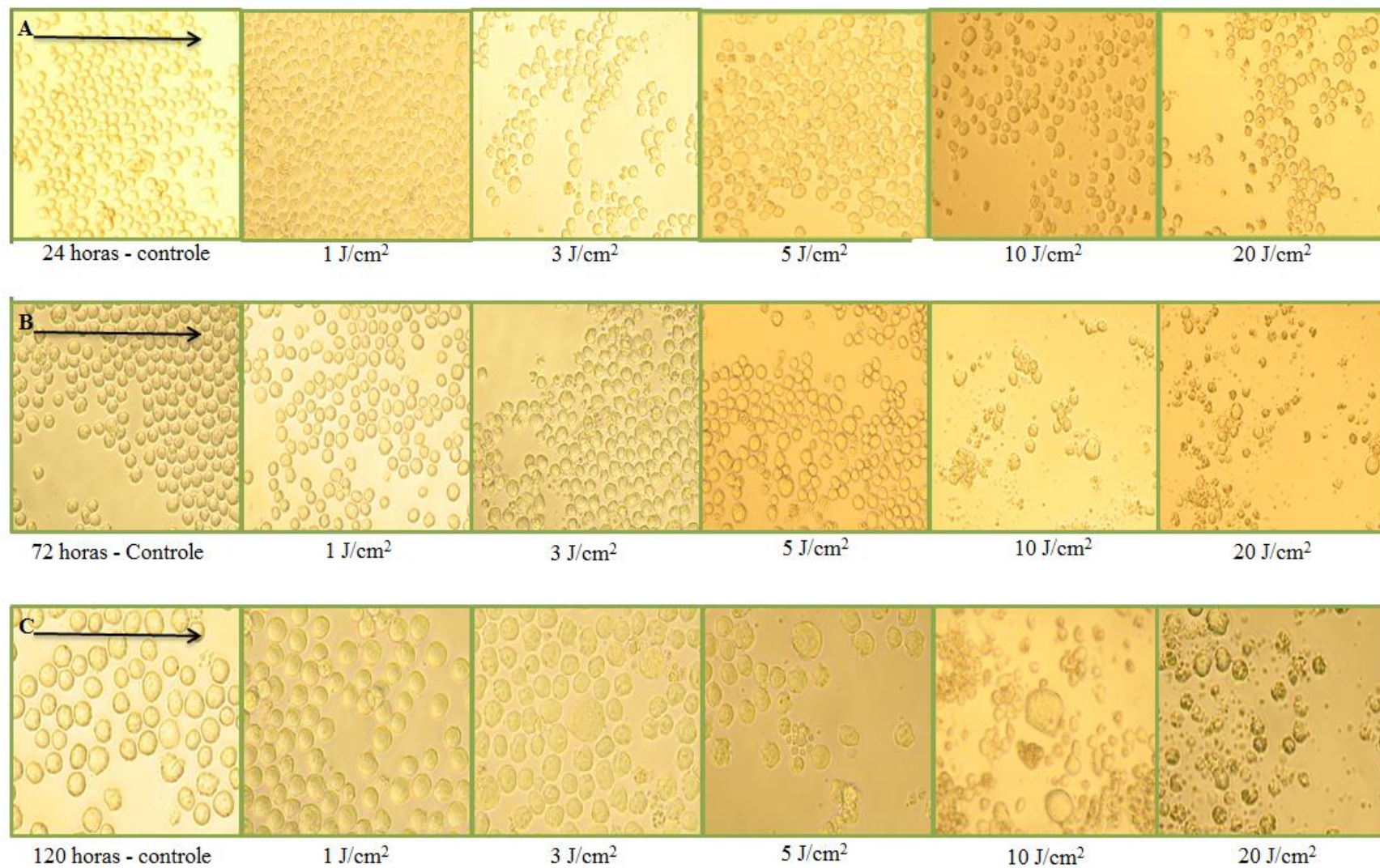
conglomerados. Na exposição de 3 e 5 J/cm<sup>2</sup> temos a presença de células com dimorfismo moderado e picnóticas com dano mais evidente. No grupo 10 J/cm<sup>2</sup> observa-se diminuto número de células com aspecto de micrólise, enrugamento das membranas celulares sem a evidência de célula com aspecto normal. Na de 20 J/cm<sup>2</sup> o grau de lesão celular é expressivo com predomínio de necrose celular. Em C, na figura 20, no registro de 120 horas, o controle permanece integro e o grupo irradiado com dose 1 J/cm<sup>2</sup> continuam com aspecto de vitalidade celular, porém percebe-se a presença de irregularidades em algumas células.

Percebesse neste momento uma diferenciação da morfologia entre os grupos irradiados com 3 e 5 J/cm<sup>2</sup>. O primeiro grupo apresenta evidência de dano em membrana e início de aparecimento de células picnóticas. Comparativamente o segundo grupo apresenta escassez de células e aumento das células picnóticas que sugerem o processo de apoptose (ZIEGLER; GROSCURTH, 2004).

A morfologia do grupo irradiado com 10 J/cm<sup>2</sup> apresentou aumento da rugosidade das membranas, células picnóticas entremeadas às células de grande diâmetro e pouco conteúdo citoplásmico sugerindo necrose e apoptose concomitantes. As células submetidas à irradiação de 20 J/cm<sup>2</sup> demonstraram piora das características morfológicas, observadas no grupo de 10 J/cm<sup>2</sup>, que remete a danos irreversíveis pelos processos de necrose e apoptose...

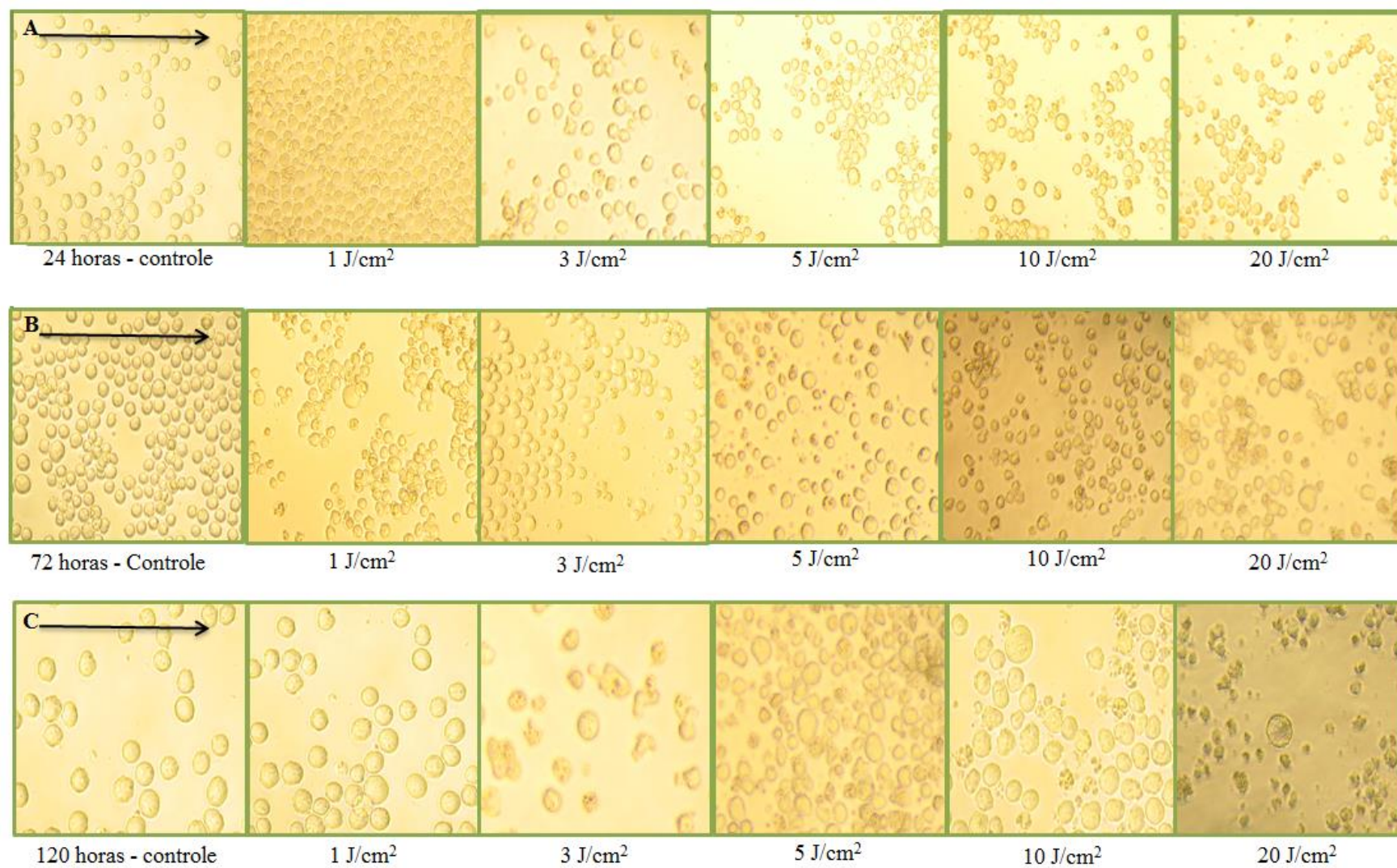
Os mesmos aspectos da irradiação são encontrados para os três tipos celulares estudados, NS1, MRSA 4-27 e MRSA 3-75. Não obstante, ocorre disparidade entre os momentos das mudanças morfológicas para cada tipo celular. As figuras 21 e 22, da direita para esquerda, mostram que os efeitos sofridos pelo grupos irradiados com 3 e 5 J/cm<sup>2</sup> já apresentavam deformidades moderadas após 24 horas, enquanto o NS1 este efeito foi detectado somente após 48 horas. Para estes mesmos grupos no momento de 72 horas há deformidades evidentes na membrana celular como: células picnóticas e dimorfismo, quando comparadas ao NS1 (72 horas).

Para as doses de 10 e 20 J/cm<sup>2</sup> os hibridomas e NS1 apresentaram morfologias similares em todos os momentos do experimento. As células exibiam evidências claras de irregularidade nas membranas, dimorfismo celular, condensação da cromatina, aumento da área livre entre as células restantes e acúmulo de restos celulares (*debris*) no meio de cultura decorrente possivelmente do processo de morte celular no momento 24 horas. A degeneração das células foi superior a 40 % após 96 horas de exposição a luz para todos os tipos celulares.

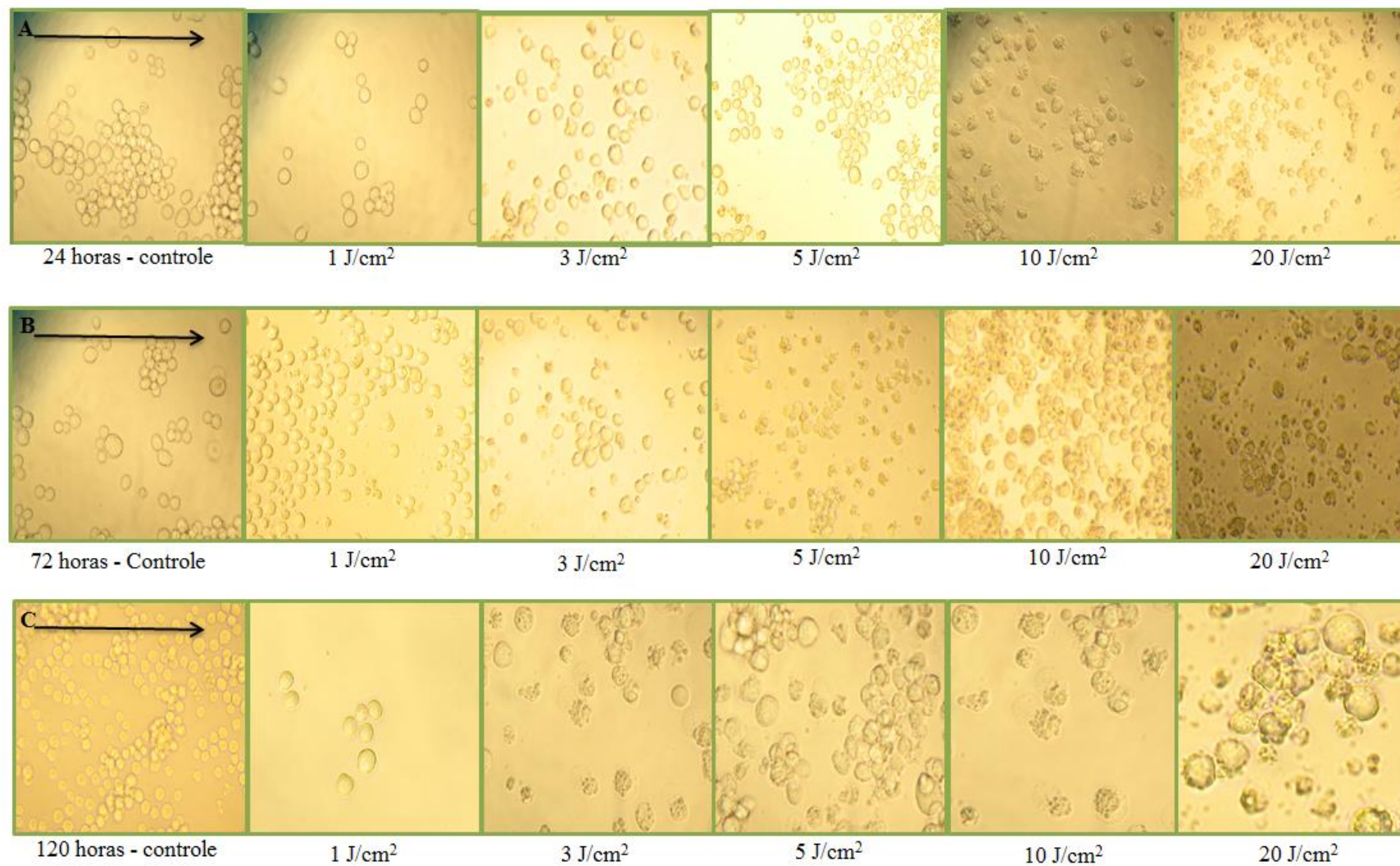


**Figura 20** – Fotodocumentação das culturas de NS1 irradiadas e controles nos momentos de 24, 72, 120 horas após início da experimental





**Figura 21** – Fotodocumentação das culturas de MRSA 4-27 irradiadas e controles nos momentos de 24, 72, 120 horas após início da experimental



**Figura 22** – Fotodocumentação das culturas de MRSA 3-75 irradiadas e controles nos momentos de 24, 72, 120 horas após início da experimental

A dose de  $1\text{J}/\text{cm}^2$  apresentou disparidade para os três tipos de células somente na determinação do número de células. O bioestimulação foi mais evidente nos NS1 em relação aos hibridomas com significância estatística ( $p<0,05$ ).

Não foram encontrados dados na literatura especializada comentando sobre alterações morfológica de membrana celular de hibridomas irradiadas com luz no comprimento de onda em 475nm. Entretanto, alterações de membranas mitocondriais são descritas na literatura.

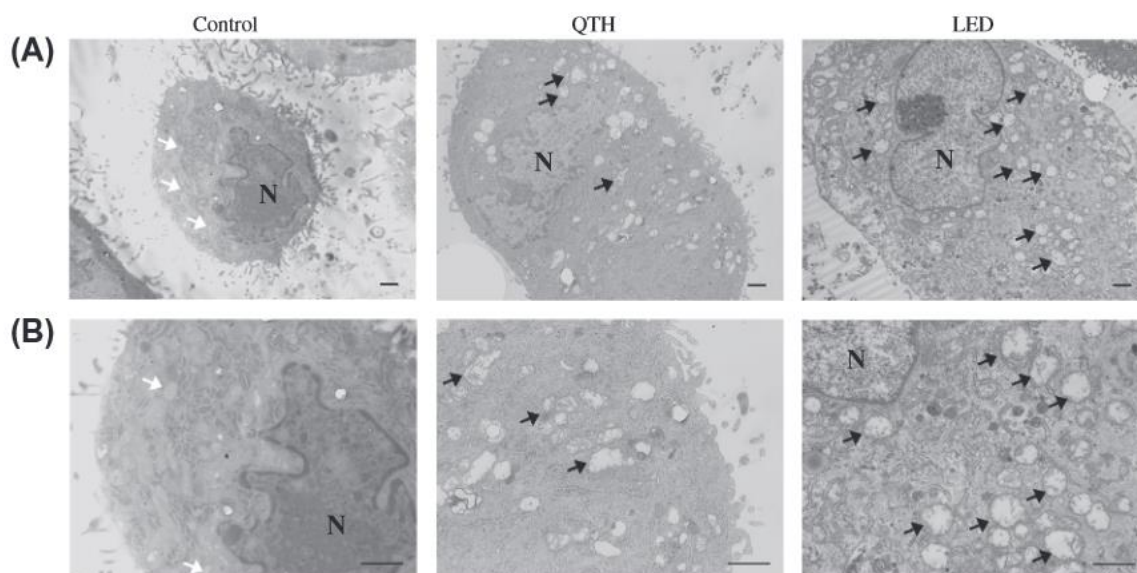
VISCOR e colaboradores usaram LASER de He-Ne com intensidade de  $0,5\text{mW}/\text{cm}^2$  para irradiar eritrócitos e observaram alterações na viscoelasticidade da membrana celular(VISCOR; PALACIOS; PALOMEQUE, 1989). SIPOSAN E LUKACS promoveram bioestimulação de eritrócitos, em amostras sanguíneas, usando LASER no comprimento de onda do 630 nm com dose entre  $0,207$  e  $9,346\text{J}/\text{cm}^2$  e justificaram que alterações de membrana (aumento de poros e área de contato) foram responsáveis pela bioestimulação(SIPOSAN; LUKACS, 2000).

Outros autores descreveram sobre a formação de mitocôndrias gigantes quando irradiadas. As principais alterações morfológicas observadas foram: aumento nas áreas das cristas (de  $0,04\mu\text{m}$  para  $0,69\mu\text{m}$ ), área de contato com retículos endoplasmáticos, aproximadamente 70%, ampliação na troca de  $\text{Ca}^{++}$ , culminando na elevação da atividade mitocondrial em 42% com aumento na proliferação celular. Entretanto, os mesmos trabalhos expuseram resultados de danos nas ultraestruturas mitocondriais. Como fragmentação das cristas, irregularidades nas membranas mitocondriais e lise promovendo acentuada a inibição do crescimento celular. Com isto concluíram que a interação luz/célula é foto dependente do comprimento de onda, dose, tempo de exposição e do tipo de metabolismo celular(BAKEEVA et al., 1993; MANTEIFEL, VM; KARU, 2005; MANTEIFEL, V; KARU, 2007).

Yoshida e colaboradores observam alterações morfológicas nas membranas mitocondriais de fibroblastos gengivais tratados com LED e lâmpada de Quartzo Tungstênio (QTH) emitido no comprimento de onda de 460nm nas doses de 15, 45 e  $75\text{J}/\text{cm}^2$ . Usando microscopia eletrônica de transmissão (MET) verificam que, apenas as mitocôndrias dos fibroblastos gengivais, foram danificadas pela ação do LED ou QTH, após 5 minutos de irradiação ( $75\text{J}/\text{cm}^2$ ) em protocolo único. A citotoxicidade das células foi evidente nas mitocôndrias que apresentaram formação de cristais, vacúolo e aumento de volume celular nos grupos tratados com LED (figura 23). Os fibroblastos tratados



com 460nm apresentaram aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e redução da proliferação celular marcadamente inferior aos grupos tratados com QTH e controle(YOSHIDA et al., 2013). Apesar das análises realizadas na presente pesquisa não incluir a MET, os resultados encontrados na microscopia de luz, corroboram aqueles de *Yoshida et al.*



**Figura 23** - (A) Efeito da irradiação com tempo de exposição de 5 minutos em fibroblastos de gengivas humanas. (B) Caracterização dos efeitos da irradiação com tempo de exposição de 5 minutos na ultraestrutura mitocondrial. No núcleo: as setas brancas apresentam as características normais da mitocôndria. As setas negras mostram que a maioria das mitocôndrias foram danificadas apresentando cristais, vacúolos aumentados após a irradiação (YOSHIDA et al., 2013).

#### 4.2 Crescimento Celular

As curvas de crescimento celular foram obtidas pela contagem das células de NS1, MRSA3-75 e MRSA 4-27 feitas em hemocitômetro a cada 24 horas pós irradiação. A análise dos dados apresentaram variações em decorrência da dose e tempo, como podem ser observadas na tabela 4 e gráfico 2.

A análise do NS1 não apresentou diferença estatística significativa, em nenhuma das doses utilizadas no momento de 24 horas de irradiação. Na dose de 1 J/cm<sup>2</sup> entre 48 e 72 horas o mieloma sofreu efeito de bioestimulação.

Os dados da Tabela 4 mostram as médias e desvio padrão entre as leituras feitas na contagem do Mieloma Murino (NS1) \* 10<sup>5</sup> células.

| <b>Tempo</b>     | <b>Controle</b> | <b>Dose 1<br/>J/cm<sup>2</sup></b> | <b>Dose 3<br/>J/cm<sup>2</sup></b> | <b>Dose 5<br/>J/cm<sup>2</sup></b> | <b>Dose 10<br/>J/cm<sup>2</sup></b> | <b>Dose 20<br/>J/cm<sup>2</sup></b> |
|------------------|-----------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| <b>0 Horas</b>   | 3.00a           | 3.00a                              | 3.00a                              | 3.00a                              | 3.00a                               | 3.00a                               |
| <b>24 Horas</b>  | 3.26a           | 3.66a                              | 3.10a                              | 3.12a                              | 2.98a                               | 2.97a                               |
| <b>48 Horas</b>  | 3.14a           | 4.62b                              | 2.95a                              | 3.01a                              | 2.90a                               | 2.79a                               |
| <b>72 Horas</b>  | 3.11a           | 4.39b                              | 2.93a                              | 2.81a                              | 2.79a                               | 2.70a                               |
| <b>96 Horas</b>  | 3.18a           | 3.77b                              | 2.92a                              | 2.71a                              | 2.71a                               | 2.27c                               |
| <b>120 Horas</b> | 3.05a           | 3.65a                              | 2.83a                              | 2.68a                              | 2.33c                               | 2.16c                               |

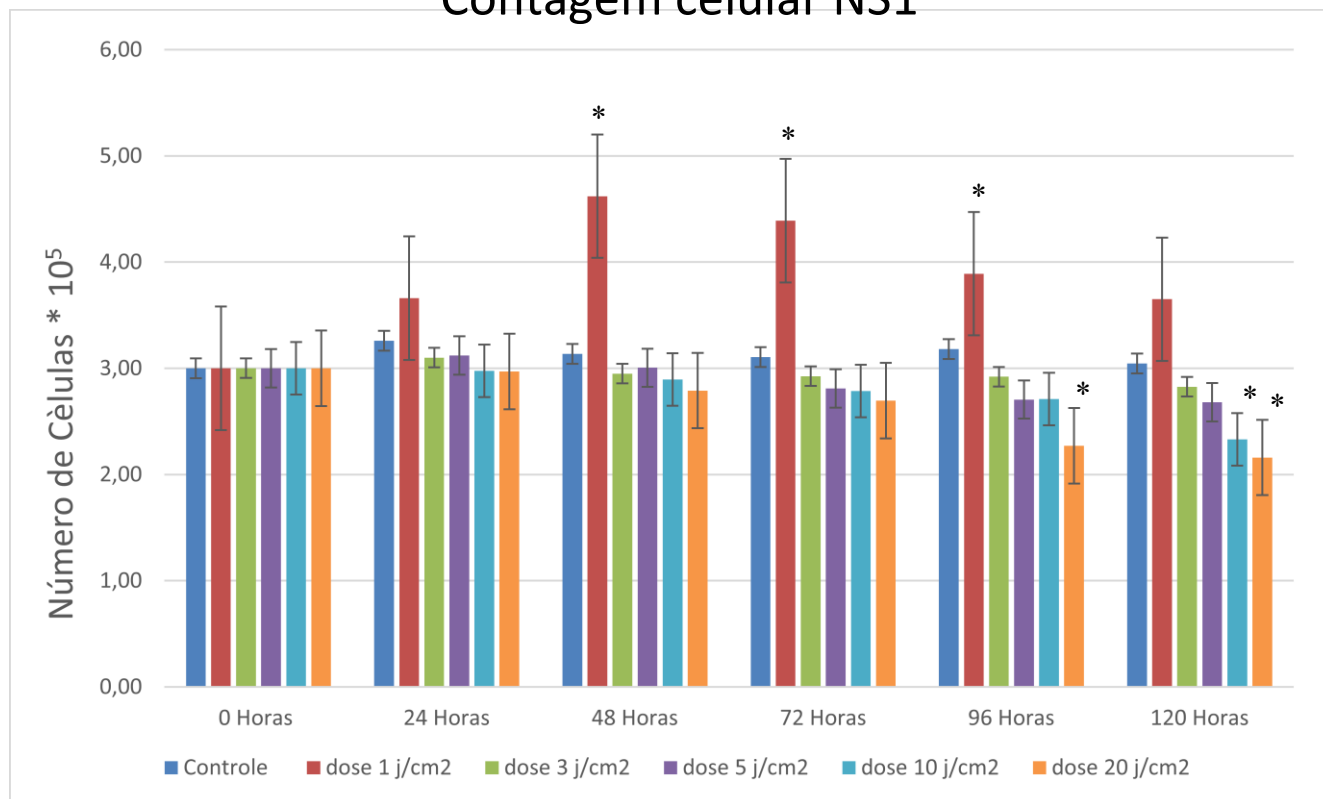
**Tabela 4** – Contagem celular do NS1 em função do tempo. Grupos seguidos com pelo menos uma letra minúscula em comum não diferem estatisticamente entre si, analisado por momento e com  $p < 0,05$ .

Os resultados analisados mostram que o números de células entre o grupo controle e grupos irradiados com dose de 1, 10 e 20 J/cm<sup>2</sup> tiveram diferenças significativas entre o tempo de 48 e 96 horas.

Para o grupo irradiado com dose de 1 J/cm<sup>2</sup> o crescimento celular foi acentuado em relação ao grupo controle entre 24 e 96 horas. No momento de 48 horas o número de células deste grupo foi superior a 30 % as do grupo controle. O declínio gradativo do número de células após 72 horas deve-se ao processo de manutenção do meio de cultura.

Os grupos irradiados com 10 e 20 J/cm<sup>2</sup> apresentaram diminuição do número de células após 96 horas em comparação ao controle. Os demais grupos não apresentaram diferenças estatística. O gráfico 3 exemplifica os dados analisados estatisticamente.

### Contagem celular NS1



**Gráfico 3** – Crescimento celular em função da dose e tempo entre grupos irradiados com LED no  $\lambda$  475 nm e grupo controle do NS1. \* Diferença significativa entre o grupo e o controle com  $p < 0,05$ .

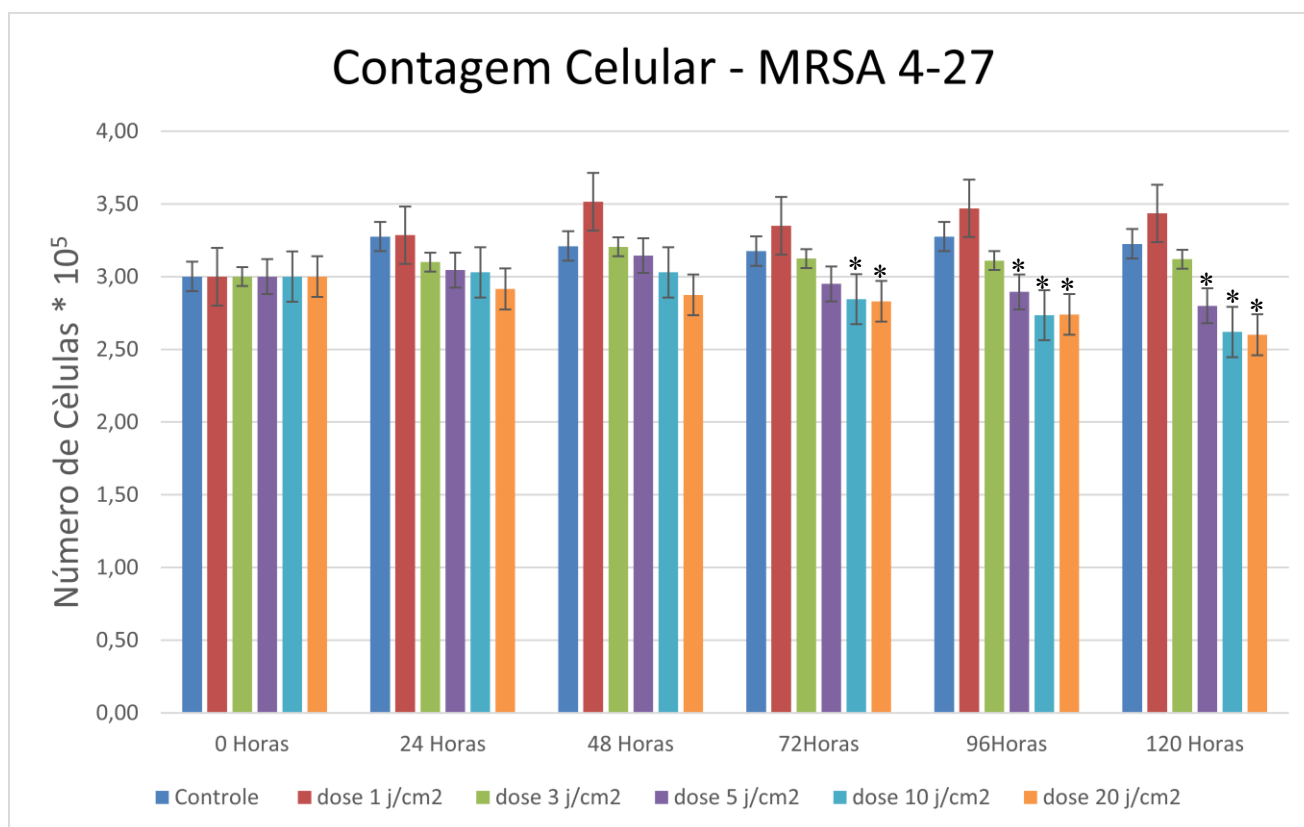
Os hibridomas não apresentaram alterações quanto ao número de células. Não foi observado efeito bioestimulador nestes tipos celulares, no entanto, o efeito bioinibidor foi identificado.

Quanto ao crescimento celular do hibridoma MRSA 4-27, os dados estão registrados na Tabela 5 com médias e desvio padrão entre as leituras feitas na contagem celular  $\times 10^5$  células.

| <b>Tempo</b>     | <b>Controle</b> | <b>Dose 1<br/>J/cm<sup>2</sup></b> | <b>Dose 3<br/>J/cm<sup>2</sup></b> | <b>Dose 5<br/>J/cm<sup>2</sup></b> | <b>Dose 10<br/>J/cm<sup>2</sup></b> | <b>Dose 20<br/>J/cm<sup>2</sup></b> |
|------------------|-----------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| <b>0 Horas</b>   | 3.00a           | 3.00a                              | 3.00a                              | 3.00a                              | 3.00a                               | 3.00a                               |
| <b>24 Horas</b>  | 3.28a           | 3.29a                              | 3.10a                              | 3.05a                              | 3.03a                               | 2.92a                               |
| <b>48 Horas</b>  | 3.21a           | 3.52a                              | 3.21a                              | 3.15a                              | 3.03a                               | 2.88a                               |
| <b>72 Horas</b>  | 3.18a           | 3.50a                              | 3.13a                              | 2.95a                              | 2.85b                               | 2.83b                               |
| <b>96 Horas</b>  | 3.28a           | 3.47a                              | 3.11a                              | 2.90b                              | 2.74b                               | 2.74b                               |
| <b>120 Horas</b> | 3.23a           | 3.44a                              | 3.12a                              | 2.80b                              | 2.62b                               | 2.60b                               |

**Tabela 5** - Números de células do hibridoma MRSA 4-27 em função do tempo. Grupos seguidos com pelo menos uma letra minúscula em comum não diferem estatisticamente entre si, analisado por momento e com  $p < 0,05$ .

Os resultados analisados mostram que o números de células entre o grupo controle e grupos irradiados com dose de 5, 10 e 20 J/cm<sup>2</sup> tiveram diferenças significativas após 72 horas, apresentando diminuição do números de células principalmente para as doses de 10 e 20 J/cm<sup>2</sup>. Não observou-se diferença estatística entre os grupos irradiado com 1 e 3 J/cm<sup>2</sup> e o grupo controle. Vale ressaltar que o grupo irradiado com dose de 1 J/cm<sup>2</sup> apresentou no momento de 48 horas números de células superior ao grupo controle, porém a diferença entre os desvios máximos e mínimos são muito sutis podendo estar embutidos dentro do erro de leitura do hemocitômetro. O gráfico 2 representa as contagens celulares do híbrido MRSA4-27.



. **Gráfico 4** – Crescimento celular em função da dose e tempo entre grupos irradiados com LED no  $\lambda$  475 nm e grupo controle do MRSA 4-27. \* Diferença significativa entre o grupo e o controle com  $p < 0,05$ .

Na análise do híbrido MRSA3-75, com características de baixo crescimento (Querino, 2012) apresentou maior susceptibilidade à luz, que o MRSA 4-27 e NS1.

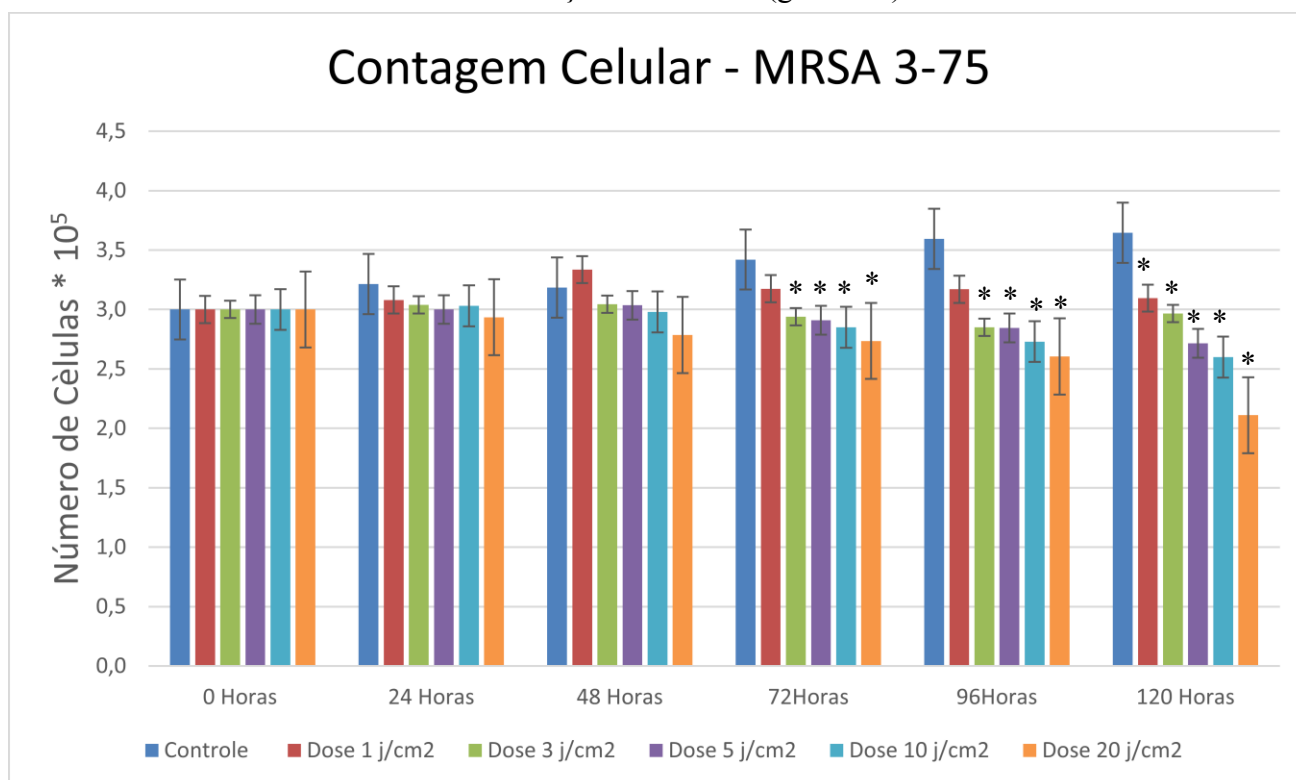
A tabela 6 mostram as médias e desvio padrão entre as leituras feitas na contagem do Híbrido MRSA 3-75.

| MRSA 3-75        | Controle          | Dose 1<br>j/cm <sup>2</sup> | Dose 3<br>j/cm <sup>2</sup> | Dose 5<br>j/cm <sup>2</sup> | Dose 10<br>j/cm <sup>2</sup> | Dose 20<br>j/cm <sup>2</sup> |
|------------------|-------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|
| <b>0 Horas</b>   | 3.00a             | 3.00a                       | 3.00a                       | 3.00a                       | 3.00a                        | 3.00a                        |
| <b>24 Horas</b>  | 3.22 <sup>a</sup> | 3.08a                       | 3.04a                       | 3.00a                       | 3.03a                        | 2.94a                        |
| <b>48 Horas</b>  | 3.19 <sup>a</sup> | 3.34a                       | 3.05a                       | 3.04a                       | 2.98a                        | 2.79a                        |
| <b>72 Horas</b>  | 3.42 <sup>a</sup> | 3.18a                       | 2.94b                       | 2.91b                       | 2.85b                        | 2.74b                        |
| <b>96 Horas</b>  | 3.60 <sup>a</sup> | 3.17a                       | 2.85b                       | 2.85b                       | 2.73b                        | 2.61b                        |
| <b>120 Horas</b> | 3.65 <sup>a</sup> | 3.10a                       | 2.97b                       | 2.72b                       | 2.60b                        | 2.11b                        |

**Tabela 6** - Números de células do híbrido MRSA 3-75 em função do tempo. Grupos seguidos com pelo menos uma letra minúscula em comum não diferem estatisticamente entre si, analisado por momento e com  $p < 0,05$ .

A análise dos dados mostrou que entre os momentos 0 a 48 horas não apresentou diferença significativa entre os grupos controle e irradiados. Após 72 horas houve diminuição gradativa no número de células em todos os grupos irradiados, exceto na dose de 1 J/cm<sup>2</sup>.

Destacamos a leitura com dose de 20 J/cm<sup>2</sup> a qual proporcionou queda superior a 55% no momento 120 horas em relação ao controle (gráfico 5).



**Gráfico 5** – Crescimento celular em função da dose e tempo entre grupos irradiados com LED no  $\lambda$  475 nm e grupo controle do MRSA 3-75. \* Diferença significativa entre o grupo e o controle com  $p < 0,05$ .

Os efeitos da luz visível no espectro do azul vem sendo utilizado como uma alternativa na terapia antineoplásica. Os estudos evidenciam sua capacidade de interromper a mitose, suprimir a atividade mitocondrial e promover danos ao DNA em tumores como: melanoma, carcinoma de células escamosas, glioma e adenocarcinoma mamário (AGGARWAL et al., 1978; SROKA et al., 1999; LOCKWOOD et al., 2005; ROTENBERG et al., 2006). Seus efeitos biológicos são iniciados por foto-redução de porfirinas endógenas, citocromos mitocondriais e flavoproteínas que traduzem os efeitos da luz em ROS que dependendo dos níveis pode mediar funções de sobrevivência da célula ou promover a morte celular (HOCKBERGER et al., 1999; LUBART; FRIEDMAN; LAVIE, 2000; ROEHLECKE et al., 2013; YOSHIDA et al., 2013).

Sroka e colaboradores arguíram que linhagens celulares de carcinoma de bexiga humana e adenocarcinoma de glândula mamária apresentaram aumento significativo na proliferação quando irradiadas com doses entre 4 e 8 J/cm<sup>2</sup> e comprimentos de onda de 410, 630, 635, 640, 805nm, contudo não observaram respostas similar para dose de 20J/cm<sup>2</sup> que permaneceu sem alterações significativas quando comparadas as células não irradiadas.(SROKA et al., 1999).

Liebmann e colaboradores verificaram que keratinocitos humanos irradiados com LED em 412 e 419nm na dose de 33 J/cm<sup>2</sup>, tiveram redução de 34% na população de células. No entanto, para a mesma dose, mas com comprimento de onda de 426 nm, não observaram diferenças estatísticas em correlação ao grupo controle(LIEBMANN; BORN; KOLB-BACHOFEN, 2010).

Nosso trabalho apresenta similaridade com os trabalhos de Sroka e Liebmann. A dose de 1 J/cm<sup>2</sup> apresentou bioestimulação para o NS1 e não interferiu no crescimento dos hibridomas. Este resultado corrobora os achados de Sroka, para doses baixas e com comprimentos de ondas próximos ao usado neste trabalho. Para as doses intermediárias 3 e 5 J/cm<sup>2</sup> não houve efeito significativos para os tipos celulares estudados. As respostas bioinibitórias ficaram evidentes para as doses de 10 e 20 J/cm<sup>2</sup>, mesmos achados descritos por Sroka e Liebmann. Uma hipótese para a resposta encontrada no presente trabalho seria a formação de ROS. Omata e colaboradores observaram que células de keratinocitos normais produziram mais ROS e tiveram mais supressão da atividade celular comparadas as células de carcinoma escamoso de boca (OSC2)(OMATA et al., 2006).

#### **4.3 Dosagem de Imunoglobulina (NANODROP)**

Os resultados obtidos nas leituras dos sobrenadantes do NS1 não diferiram dos valores encontrados do meio de cultura (Padrão negativo de leitura). Esta observação corrobora que a ação da luz não alterou a principal característica do Mieloma Murino (NS1) em não sintetizar e secretar Ig.

As dosagem de Ig produzidos pelos hibridomas foram realizadas em equipamento Nanodrop 1000®. A determinação das concentrações de imunoglobulina foram normalizadas através da diferença entre a leitura do sobrenadante dos híbridos e da leitura do meio de cultura.

As apreciações da produção de imunoglobulina do MRSA 4-27 mostraram alterações significativas e distintas após exposição ao LED em 475nm quando comparadas ao grupo controle. A tabela 7 mostra as leituras normalizadas para o hibridoma.

| <b>Tempo</b>     | <b>Controle</b> | <b>Dose 1<br/>J/cm<sup>2</sup></b> | <b>Dose 3<br/>J/cm<sup>2</sup></b> | <b>Dose 5<br/>J/cm<sup>2</sup></b> | <b>Dose 10<br/>J/cm<sup>2</sup></b> | <b>Dose 20<br/>J/cm<sup>2</sup></b> |
|------------------|-----------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| <b>0 Horas</b>   | 1,51a           | 1,53a                              | 1,58a                              | 1,55a                              | 1,52a                               | 1,48a                               |
| <b>24 Horas</b>  | 1.54a           | 2.01b                              | 1.97b                              | 1.94b                              | 1.94a                               | 0.82d                               |
| <b>48 Horas</b>  | 1.54a           | 2.16b                              | 1.75a                              | 1.72a                              | 1.74a                               | 0.66d                               |
| <b>72 Horas</b>  | 1.55a           | 1.99b                              | 1.56a                              | 1.43a                              | 1.57a                               | 0.54d                               |
| <b>96 Horas</b>  | 1.40a           | 2.03b                              | 1.41a                              | 1.11c                              | 1.17c                               | 0.32d                               |
| <b>120 Horas</b> | 1.39a           | 1.99b                              | 1.44a                              | 1.13c                              | 1.09c                               | 0.40d                               |

**Tabela 7 – Síntese de imunoglobulina do hibridoma MRSA 4-27.** Grupos seguidos com pelo menos uma letra minúscula em comum não diferem estatisticamente entre si, analisado por momento e com  $p < 0,05$ .

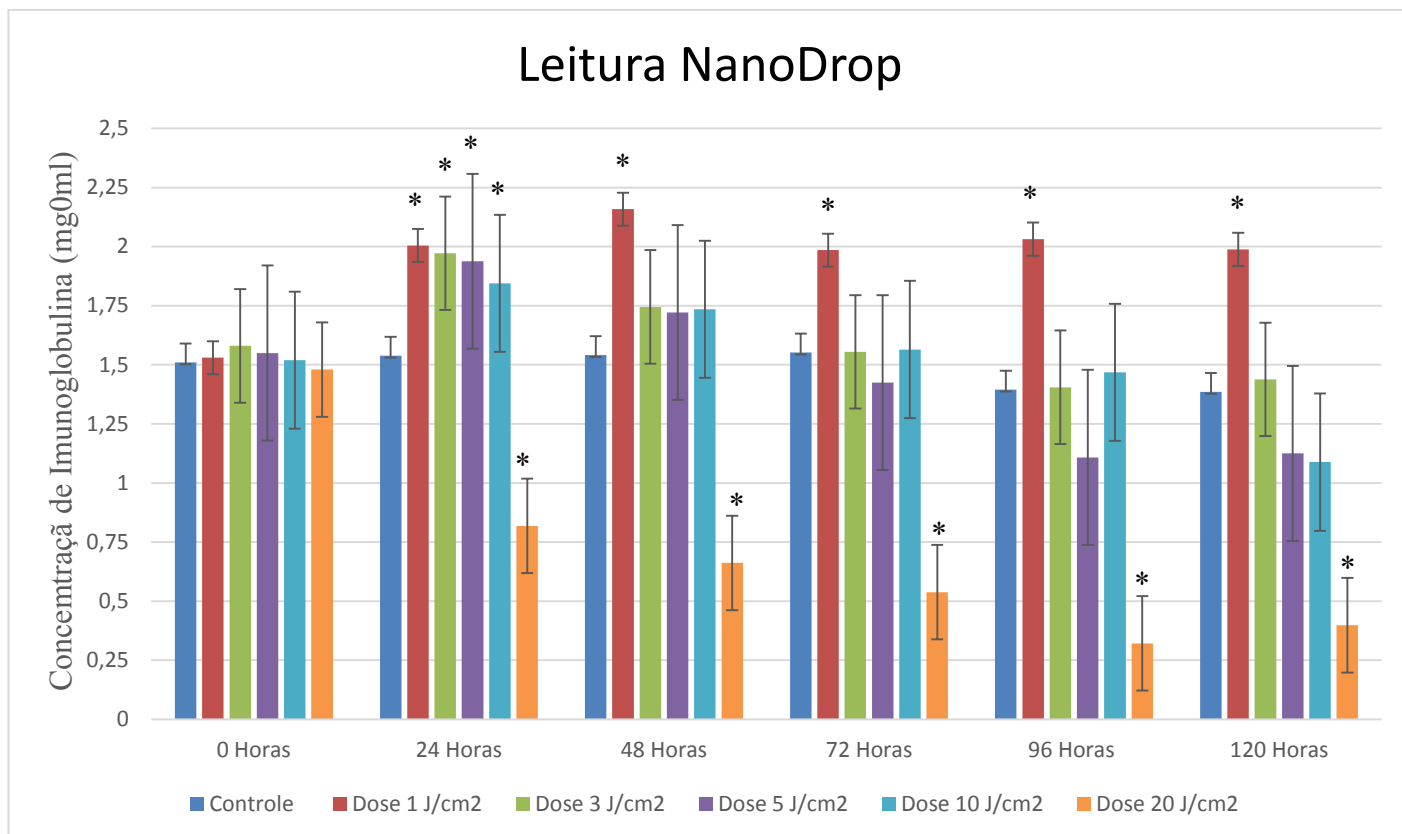
Observamos efeito bioestimulador expressivo na secreção de imunoglobulinas a partir de 24 horas para o grupo irradiado com  $1 \text{ J/cm}^2$  quando comparado com o controle. A síntese de Ig neste grupo durante todo o experimental manteve níveis superiores a 35% frente ao grupo controle.

Para os grupos irradiados com dose de 3, 5 e  $10 \text{ J/cm}^2$ , o efeito de bioestimulação ocorre após 24 horas e retorna para os níveis normais de secreção no momento de 48 horas. Após 96 horas temos efeito bioinibidor para os grupos de 5 e  $10 \text{ J/cm}^2$ .

O grupo irradiado com  $20 \text{ J/cm}^2$  apresentou queda significativa na produção de anticorpos após o momento de 48 horas decorrente de morte celular.

A dose de  $20 \text{ J/cm}^2$  causou 55% de bioinibição na síntese de Ig nas primeiras 24 horas pós exposição a luz, permanecendo em queda progressiva em todos os tempos analisados atingindo um índice de aproximadamente 70% de redução na síntese de anticorpos. Portanto, trata-se de uma dose bioinibidora para o hibridoma MRSA4-27. O gráfico 6 mostra as leituras realizadas em triplicata.





**Gráfico 6 – Quantificação da concentração** de imunoglobulina sintetizada pelo hibridoma MRSA 4-27. \*Diferença significativa entre o grupo e o controle com  $p < 0,05$ .

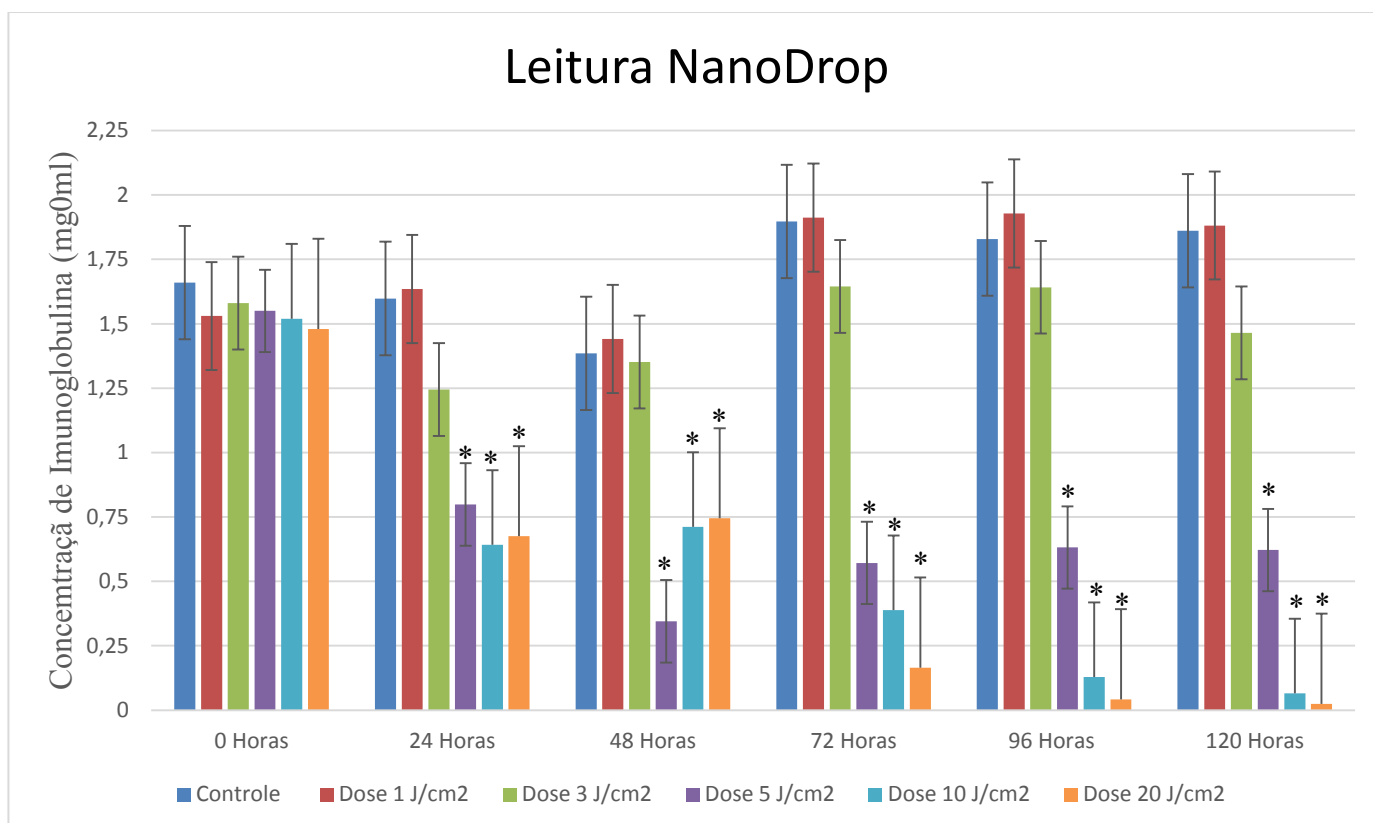
De maneira similar, porém mais acentuada, o hibridoma MRSA 3-75 apresentou queda gradativa e significativa nas concentrações de Ig quando irradiadas com dose acima de  $5 \text{ j/cm}^2$ , (tabela 8)

| Tempo     | Controle | Dose 1<br>J/cm <sup>2</sup> | Dose 3<br>J/cm <sup>2</sup> | Dose 5<br>J/cm <sup>2</sup> | Dose 10<br>J/cm <sup>2</sup> | Dose 20<br>J/cm <sup>2</sup> |
|-----------|----------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 24 Horas  | 1.60a    | 1.64a                       | 1.25a                       | 0.80a                       | 0.64a                        | 0.68a                        |
| 48 Horas  | 1.39a    | 1.44a                       | 1.35a                       | 0.35b                       | 0.71b                        | 0.75b                        |
| 72 Horas  | 2.00a    | 2.12a                       | 1.65a                       | 0.57b                       | 0.39b                        | 0.17b                        |
| 96 Horas  | 1.76a    | 2.03a                       | 1.64a                       | 0.63b                       | 0.13b                        | 0.04b                        |
| 120 Horas | 1.76a    | 1.88a                       | 1.47a                       | 0.62b                       | 0.06b                        | 0.02b                        |

**Tabela 8 - Síntese de imunoglobulina do hibridoma MRSA 3-75.** Grupos seguidos com pelo menos uma letra minúscula em comum não diferem estatisticamente entre si, analisado por momento e com  $p < 0,05$ .

Os grupos 5, 10 e 20 J/cm<sup>2</sup> apresentaram queda superior a 50 % na produção de imunoglobulina após 24 horas da exposição a luz com queda gradativa durante todo o experimento. Destaque-se a supressão da síntese de anticorpos, superior 90%, nas doses de 10 e 20 J/cm<sup>2</sup>.

Os grupos 1 e 3 J/cm<sup>2</sup> não apresentaram diferença significativa entre si e em comparação com o grupo controle em todo o experimento (gráfico 7).



**Gráfico 7 – Quantificação da concentração** de imunoglobulina sintetizada pelo hibridoma MRSA 3-75.  
\*Diferença significativa entre o grupo e o controle com  $p < 0,05$ .

Os resultados encontrados para os hibridomas apontam para um aproveitamento da exposição de clones secretores de anticorpos monoclonais na fluência de 1 J/cm<sup>2</sup>, tendo em vista que houve efeito bioestimulador (hibrido MRSA 4-27).

Este resultado pode se tornar impactante quando da produção industrial de anticorpos monoclonais de uso terapêutico, considerados hoje, como ouro líquido. No ano de 2012, os anticorpos monoclonais terapêuticos correspondiam a 40% do mercado internacional de produtos biotecnológicos da saúde humana, envolvendo uma fatura anual de U\$50 bilhões de dólares, dos quais, U\$20 bilhões corresponde a fatura de apenas 5 anticorpos de uso terapêutico (PRASHANT, 2013).

#### 4.4 Viabilidade Celular

As mitocôndrias são as principais organelas envolvidas na transdução do sinal e execução da morte celular. A apoptose é um processo fisiológico necessário para manutenção da homeostase. As células respondem a estímulos como: restrição de fator de crescimento, danos ao DNA, choque térmico, irradiações, medicamentos quimioterápicos e aumento de ROS (HENGARTNER, 2000; ELMORE, 2007; PRADELLI; BÉNÉTEAU; RICCI, 2010).

A morte celular por necrose pode ser desencadeada por irradiação ou agentes tóxicos. Neste processo após insulto severo a célula apresenta aumento de volume celular, agregação da cromatina, desordem citoplasmática e perda da membrana plasmática com lise. Na necrose a membrana torna-se permeável mais precoce permitindo que moléculas carregadas ultrapassem para o citosol. Assim o Iodeto de Propídeo e corantes podem ser empregados para detecção da permeabilidade da membrana (ZIEGLER; GROSCURTH, 2004).

Na apoptose a externalização de fosfatidilserina é um dos primeiros indícios da sinalização celular para fagocitose (WU; TIBREWAL; BIRGE, 2006). Com isto a detecção da fosfatidilserina *in vitro* através da marcação com anexina V apresenta alta afinidade para seu diagnóstico (ZIEGLER; GROSCURTH, 2004; ELMORE, 2007; JANKO et al., 2013).

As etapas de destruição da célula podem ocorrer ao mesmo tempo (ZIEGLER; GROSCURTH, 2004). Dessa forma a dupla marcação de uma mesma célula com dois corantes permite maior fidelidade na determinação da necrose e apoptose tardia. Assim a associação da anexina V com Iodeto de Propídeo possibilita mensurar células com membrana plasmática permeável. Em ambos os processos a anexina V reage com a membrana ao mesmo tempo em que o PI entra no citosol. (RIESEBERG et al., 2001; PEC et al., 2003).

A concentração de células viáveis na cultura celular é um dos pontos críticos no controle na indústria de biotecnologia. Assim a integridade da membrana celular pode ser detectada por Citometria de fluxo identificando em qual fase do ciclo celular estão as células (RIESEBERG et al., 2001). Com o mesmo intuito a determinação da atividade mitocondrial pelo ensaio de MTT permite monitorar a viabilidade celular após injúria (WERNER et al., 2013).

Os ensaios de viabilidade celular foram realizados por marcação dos grupos experimentais com Anexina V + PI (Citometria de Fluxo) e MTT. Ambos os ensaios não apresentaram diferenças significativas entre si. Sendo que todas as células irradiadas apresentaram redução gradativa de suas viabilidades dependentes da dose empregada e tempo.

Nas análises por Citometria de Fluxo os NS1 irradiados com 1J/cm<sup>2</sup> apresentaram queda de viabilidades em 24% (24 horas) e 30% (72 horas), possivelmente devido ao excesso do número de células/poço com evolução para necrose e apoptose tardia. Isto se deve ao efeito bioestimulador do metabolismo celular. O aumento abrupto das células promoveu escassez dos nutrientes no meio de cultura culminando com concorrência e morte de parte da população de estudo.

O grupo 3 J/cm<sup>2</sup> apresentou 22% de morte (necrose e apoptose tardia) até 72 horas de tratamento com evolução para 50% em 120 horas. O mesmo foi observado nos grupos irradiados com 5 J/cm<sup>2</sup> com 30% de células em morte até 72 horas e 45% em 120 horas.

A destruição foi marcante nos grupos 10 e 20 J/cm<sup>2</sup> depois de 48 horas, com mais de 35% da população em morte programada avançada e início de necrose e após 120 horas de tratamento observou-se 75% de morte celular (necrose/apoptose tardia).

Para MRSA 4-27 a dose de 1J/cm<sup>2</sup> durante exposição de 120 horas manteve viabilidade superior a 80%. Nas doses 3 e 5 J/cm<sup>2</sup> as células apresentaram queda de 14% e 17% entre 72 e 120 horas, respectivamente.

Seu perfil após exposição a 10 e 20 J/cm<sup>2</sup> apresentou queda gradativa depois 48 horas com morte aproximada de 75% da população deste hibridoma.

As análises do MRSA 3-75 apresentaram maior resposta a luz em 475nm em comparação com os demais grupos celulares do estudo. O hibridoma apresentou queda na viabilidade em 25% para as doses de 1 e 3 J/cm<sup>2</sup> após 120 horas.

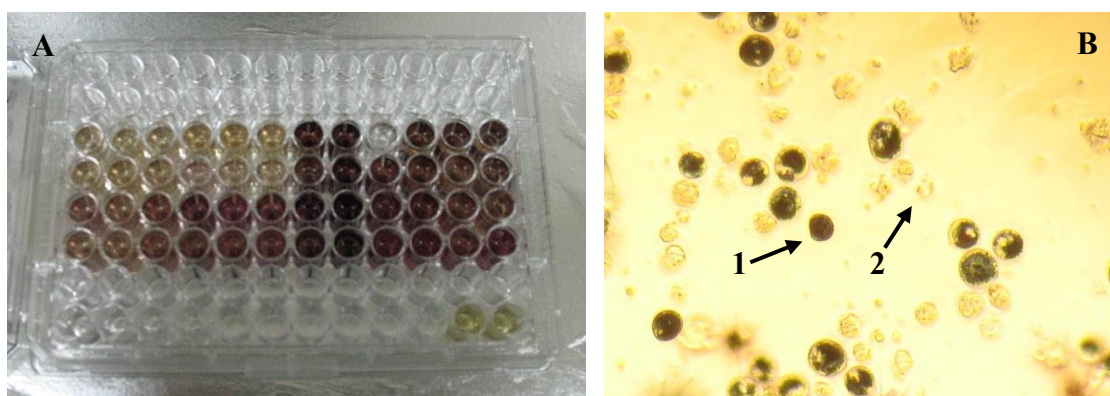
Nas irradiações com 5 e 10 J/cm<sup>2</sup> foram detectados queda da viabilidade a partir de 48 horas. Onde aproximadamente 50% da população em estudo foi eliminada até 120 horas.

As maiores quedas na viabilidade celular foram observadas na dose de 20 J/cm<sup>2</sup> com marcantes reduções na população. Após 24 horas, foi detectado 29,3% de morte celular. Este quadro sofreu piora gradativa com evolução para 50% de morte em 48 horas e 72% após 120 horas de tratamento.

Os valores encontrados na avaliação da atividade mitocondrial pelo ensaio de MTT foram similares aos expostos para citometria de fluxo (figura 24 e gráfico 8). Ouve quedas significativas nas doses superiores a  $5 \text{ J/cm}^2$  no momento superior a 72 horas em todos os grupos experimentais e para os três tipos celulares.

As doses de  $10$  e  $20 \text{ J/cm}^2$  promoveram queda de 70% da viabilidade no fim do experimento, demonstrando a ação citotóxica da luz sobre as células.

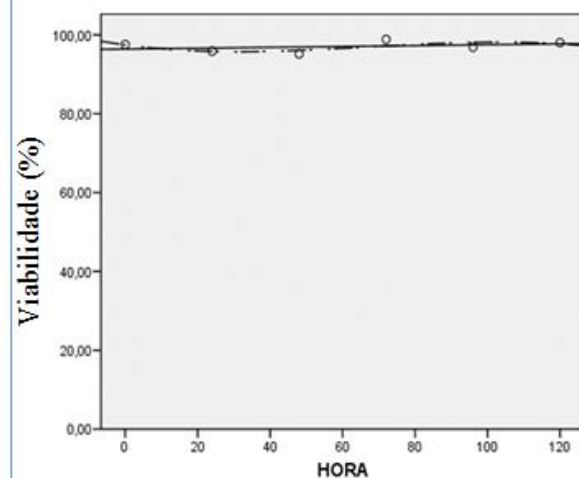
Não houve diminuição da viabilidade em células mantidas na ausência de exposição a luz (grupo controle).



**Figura 24** – Foto A - placa de leitura de teste MTT, foto B indica aspecto microscópico das células coradas por formazan (1: célula com atividade mitocondrial, 2 célula sem atividade mitocondrial).

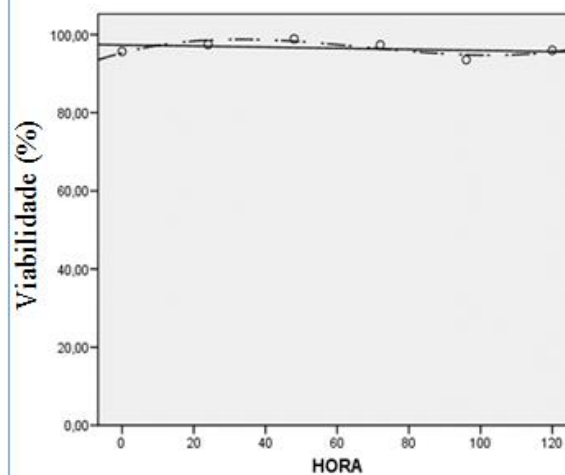
Gráfico Citometria de Fluxo (Grupo Controle)

## NS1



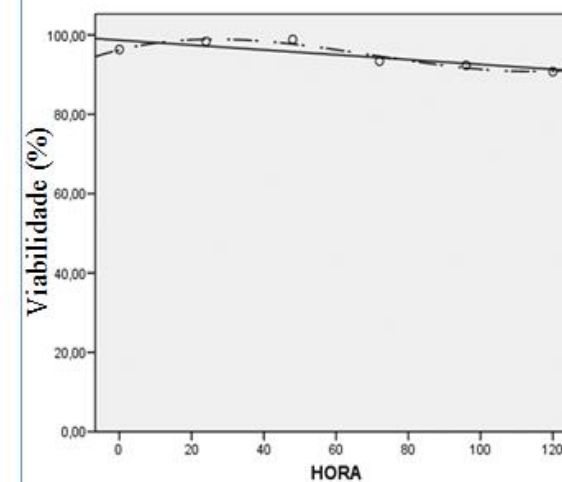
| Dose | Modelo | R <sup>2</sup> | p *   | IC95%      |
|------|--------|----------------|-------|------------|
| 0    | Linear | 0.13           | 0.485 | (93 - 103) |
|      | Cubica | 0.45           | 0.699 | (88 - 107) |

## MRSA 4-27



| Dose | Modelo | R <sup>2</sup> | p *   | IC95%     |
|------|--------|----------------|-------|-----------|
| 0    | Linear | 0.68           | 0.044 | (84 - 98) |
|      | Cubica | 0.93           | 0.099 | (83 - 99) |

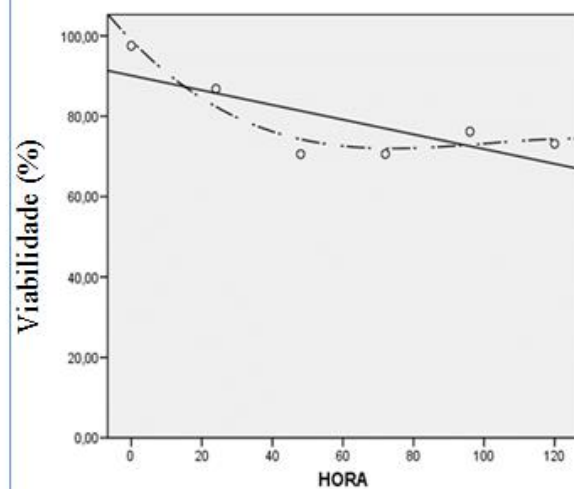
## MRSA 3-75



| Dose | Modelo | R <sup>2</sup> | p *   | IC95%      |
|------|--------|----------------|-------|------------|
| 0    | Linear | 0.12           | 0.503 | (89 - 102) |
|      | Cubica | 0.74           | 0.368 | (87 - 105) |

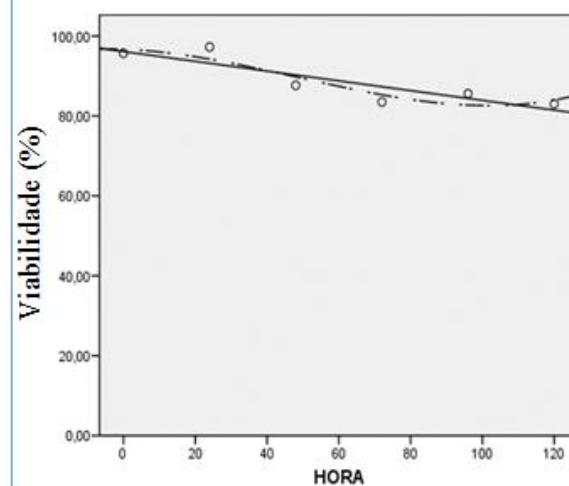
Gráfico Citometria de Fluxo (Grupo Dose 1J/cm<sup>2</sup>)

NS1



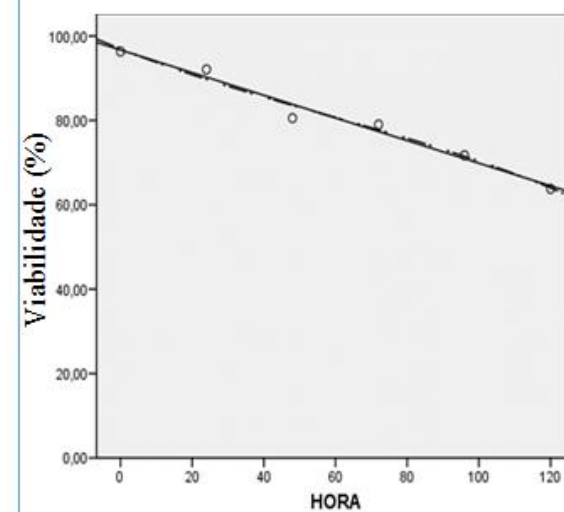
| Dose                | Modelo | R <sup>2</sup> | p *   | IC95%      |
|---------------------|--------|----------------|-------|------------|
| 1 J/cm <sup>2</sup> | Linear | 0.57           | 0.081 | (41 - 95)  |
|                     | Cubica | 0.92           | 0.123 | (44 - 104) |

MRSA 4-27



| Dose                | Modelo | R <sup>2</sup> | p *   | IC95%      |
|---------------------|--------|----------------|-------|------------|
| 1 J/cm <sup>2</sup> | Linear | 0.78           | 0.019 | (70 - 93)  |
|                     | Cubica | 0.86           | 0.204 | (61 - 106) |

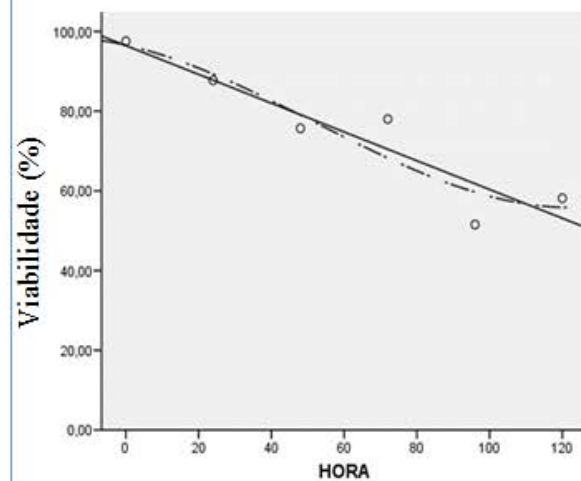
MRSA 3-75



| Dose                | Modelo | R <sup>2</sup> | p *   | IC95%     |
|---------------------|--------|----------------|-------|-----------|
| 1 J/cm <sup>2</sup> | Linear | 0.98           | 0.000 | (57 - 72) |
|                     | Cubica | 0.98           | 0.034 | (46 - 82) |

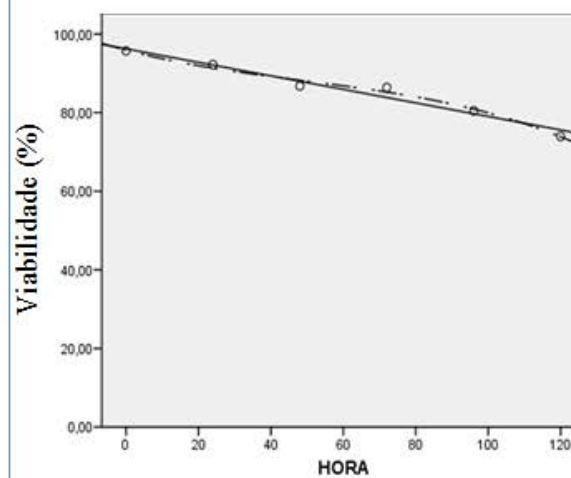
Gráfico Citometria de Fluxo (Grupo Dose 3J/cm<sup>2</sup>)

NS1



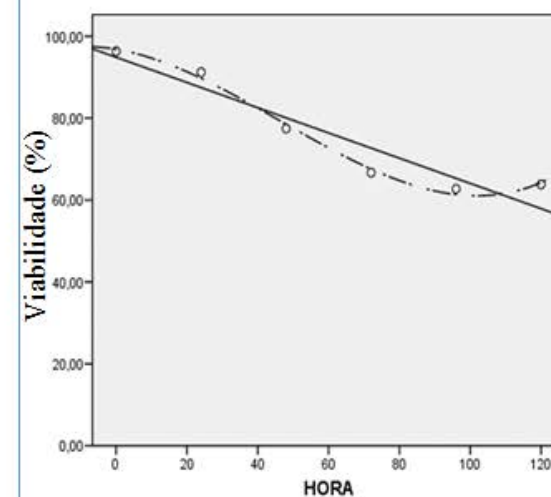
| Dose                | Modelo | R <sup>2</sup> | p *   | IC95%     |
|---------------------|--------|----------------|-------|-----------|
| 3 J/cm <sup>2</sup> | Linear | 0.87           | 0.007 | (29 - 77) |
|                     | Cubica | 0.88           | 0.174 | (0 - 113) |

MRSA 4-27



| Dose                | Modelo | R <sup>2</sup> | p *   | IC95%     |
|---------------------|--------|----------------|-------|-----------|
| 3 J/cm <sup>2</sup> | Linear | 0.91           | 0.003 | (41 - 75) |
|                     | Cubica | 0.99           | 0.009 | (53 - 75) |

MRSA 3-75

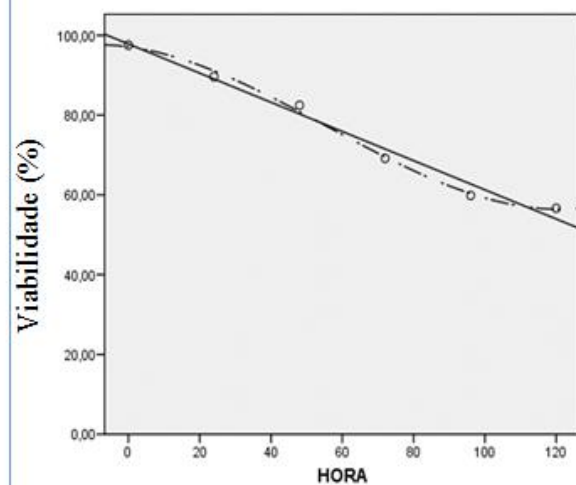


| Dose                | Modelo | R <sup>2</sup> | p *   | IC95%     |
|---------------------|--------|----------------|-------|-----------|
| 3 J/cm <sup>2</sup> | Linear | 0.96           | 0.001 | (70 - 81) |
|                     | Cubica | 0.99           | 0.022 | (65 - 83) |



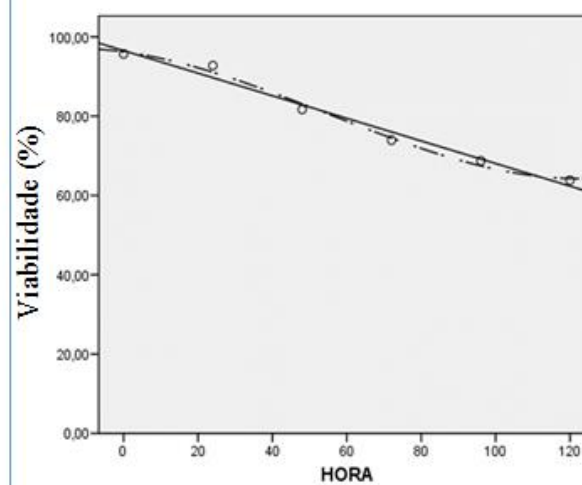
Gráfico Citometria de Fluxo (Grupo Dose 5 J/cm<sup>2</sup>)

NS1



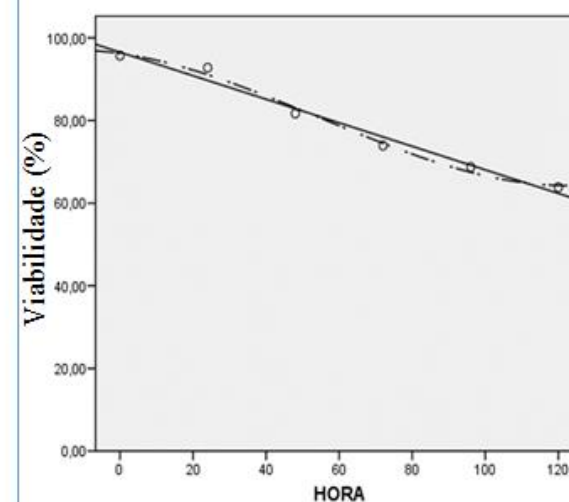
| Dose                | Modelo | R <sup>2</sup> | p *   | IC95%     |
|---------------------|--------|----------------|-------|-----------|
| 5 J/cm <sup>2</sup> | Linear | 0.98           | 0.000 | (45 - 63) |
|                     | Cubica | 1.00           | 0.006 | (47 - 66) |

MRSA 4-27



| Dose                | Modelo | R <sup>2</sup> | p *   | IC95%     |
|---------------------|--------|----------------|-------|-----------|
| 5 J/cm <sup>2</sup> | Linear | 0.98           | 0.000 | (55 - 70) |
|                     | Cubica | 0.99           | 0.013 | (53 - 75) |

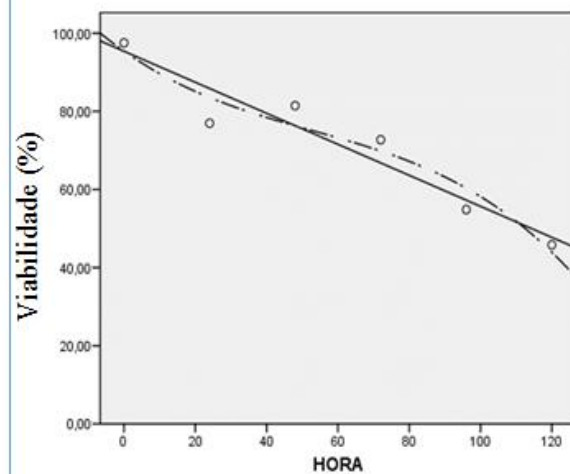
MRSA 3-75



| Dose                | Modelo | R <sup>2</sup> | p *   | IC95%     |
|---------------------|--------|----------------|-------|-----------|
| 5 J/cm <sup>2</sup> | Linear | 0.96           | 0.001 | (31 - 61) |
|                     | Cubica | 1.00           | 0.002 | (45 - 58) |

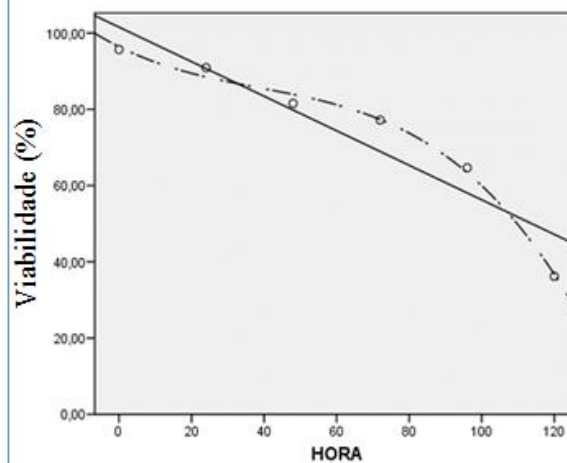
Gráfico Citometria de Fluxo (Grupo Dose 10 J/cm<sup>2</sup>)

## NS1



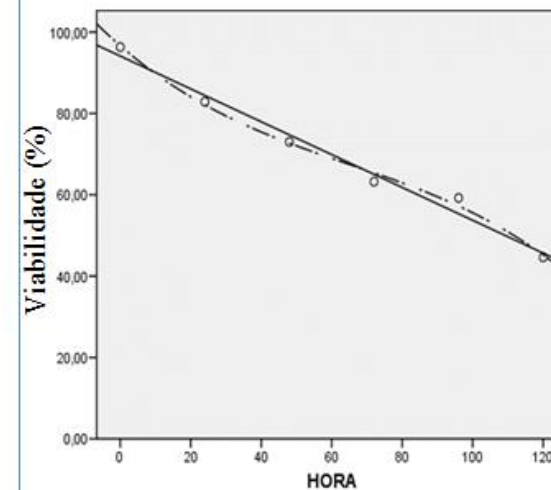
| Dose                 | Modelo | R <sup>2</sup> | p *   | IC95%     |
|----------------------|--------|----------------|-------|-----------|
| 10 J/cm <sup>2</sup> | Linear | 0.91           | 0.003 | (26 - 69) |
|                      | Cubica | 0.93           | 0.098 | (0 - 89)  |

## MRSA 4-27



| Dose                 | Modelo | R <sup>2</sup> | p *   | IC95%     |
|----------------------|--------|----------------|-------|-----------|
| 10 J/cm <sup>2</sup> | Linear | 0.88           | 0.005 | (19 - 75) |
|                      | Cubica | 0.99           | 0.009 | (20 - 52) |

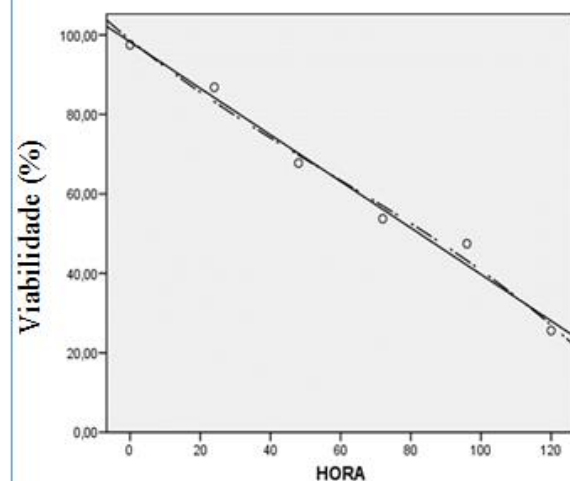
## MRSA 3-75



| Dose                 | Modelo | R <sup>2</sup> | p *   | IC95%     |
|----------------------|--------|----------------|-------|-----------|
| 10 J/cm <sup>2</sup> | Linear | 0.98           | 0.000 | (36 - 55) |
|                      | Cubica | 0.99           | 0.009 | (32 - 58) |

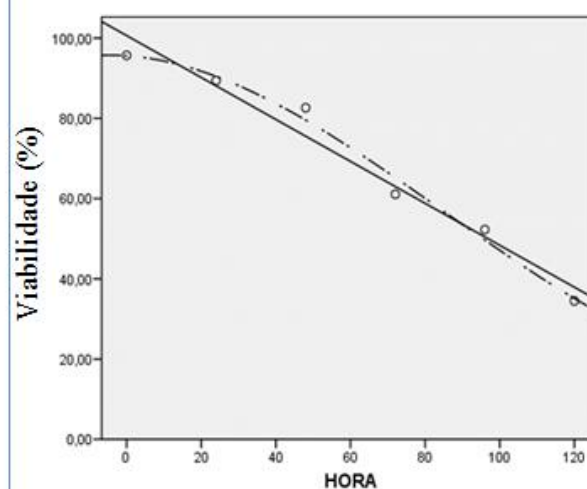
Gráfico Citometria de Fluxo de Fluxo (Grupo Dose 20 J/cm<sup>2</sup>)

NS1



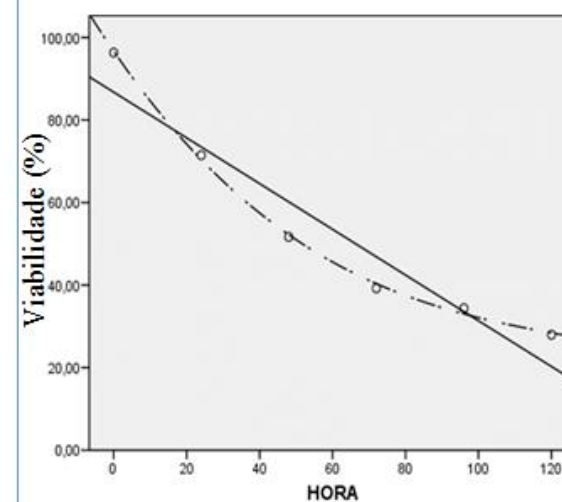
| Dose                 | Modelo | R <sup>2</sup> | p *   | IC95%     |
|----------------------|--------|----------------|-------|-----------|
| 20 J/cm <sup>2</sup> | Linear | 0.98           | 0.000 | (15 - 41) |
|                      | Cubica | 0.99           | 0.021 | (0 - 56)  |

MRSA 4-27



| Dose                 | Modelo | R <sup>2</sup> | p *   | IC95%     |
|----------------------|--------|----------------|-------|-----------|
| 20 J/cm <sup>2</sup> | Linear | 0.97           | 0.000 | (21 - 55) |
|                      | Cubica | 0.99           | 0.018 | (10 - 60) |

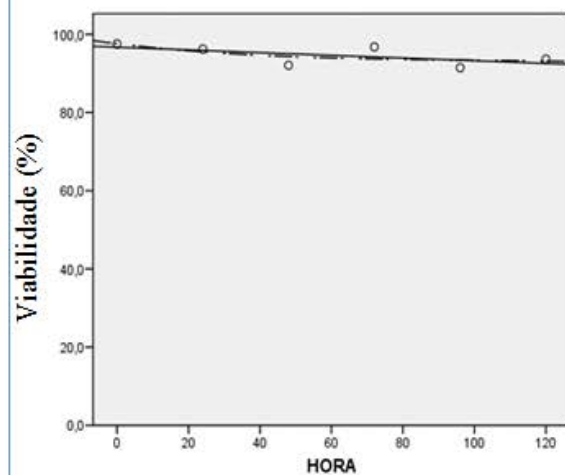
MRSA 3-75



| Dose                 | Modelo | R <sup>2</sup> | p *   | IC95%     |
|----------------------|--------|----------------|-------|-----------|
| 20 J/cm <sup>2</sup> | Linear | 0.92           | 0.003 | (0 - 49)  |
|                      | Cubica | 1.00           | 0.002 | (19 - 38) |

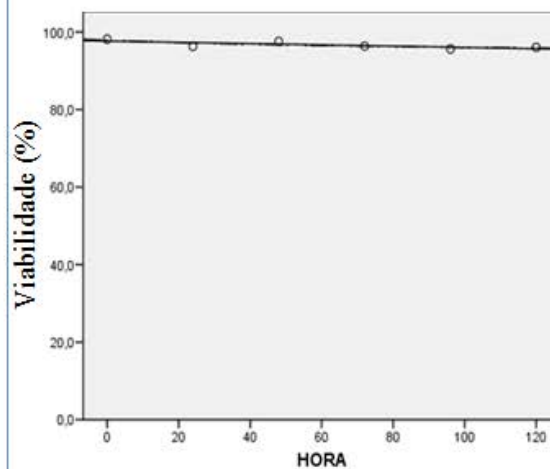
Gráfico Viabilidade MTT (Grupo Controle)

NS1



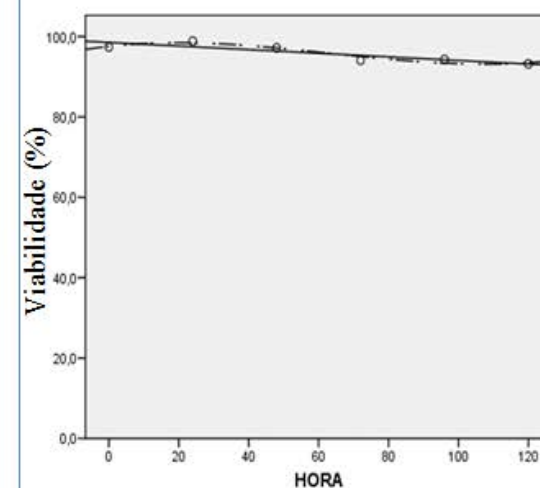
| Dose | Modelo | R <sup>2</sup> | p *   | IC95%      |
|------|--------|----------------|-------|------------|
| 0    | Linear | 0.36           | 0.207 | (85 - 100) |
|      | Cubica | 0.43           | 0.722 | (75 - 112) |

MRSA 4-27



| Dose | Modelo | R <sup>2</sup> | p *   | IC95%      |
|------|--------|----------------|-------|------------|
| 0    | Linear | 0.57           | 0.084 | (93 - 98)  |
|      | Cubica | 0.60           | 0.540 | (90 - 102) |

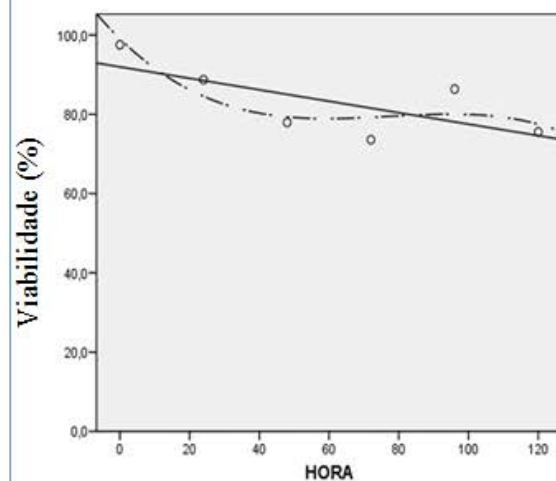
MRSA 3-75



| Dose | Modelo | R <sup>2</sup> | p *   | IC95%     |
|------|--------|----------------|-------|-----------|
| 0    | Linear | 0.79           | 0.018 | (89 - 97) |
|      | Cubica | 0.92           | 0.116 | (88 - 99) |

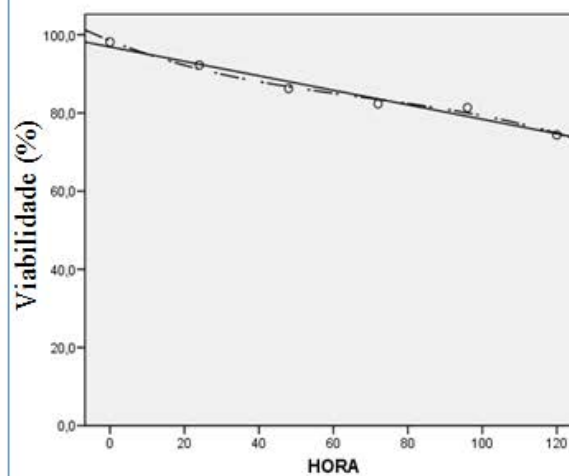
Gráfico Viabilidade MTT (Grupo Dose 1 J/cm<sup>2</sup>)

NS1



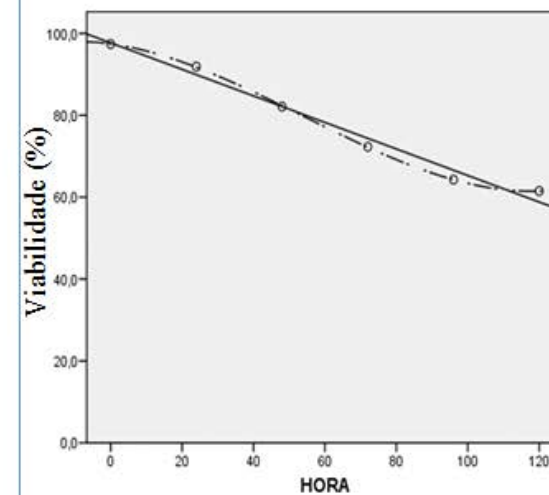
| Dose                | Modelo | R <sup>2</sup> | p *   | IC95%      |
|---------------------|--------|----------------|-------|------------|
| 1 J/cm <sup>2</sup> | Linear | 0.50           | 0.118 | (50 - 100) |
|                     | Cubica | 0.77           | 0.324 | (35 - 120) |

MRSA 4-27



| Dose                | Modelo | R <sup>2</sup> | p *   | IC95%     |
|---------------------|--------|----------------|-------|-----------|
| 1 J/cm <sup>2</sup> | Linear | 0.97           | 0.000 | (69 - 80) |
|                     | Cubica | 0.99           | 0.019 | (66 - 84) |

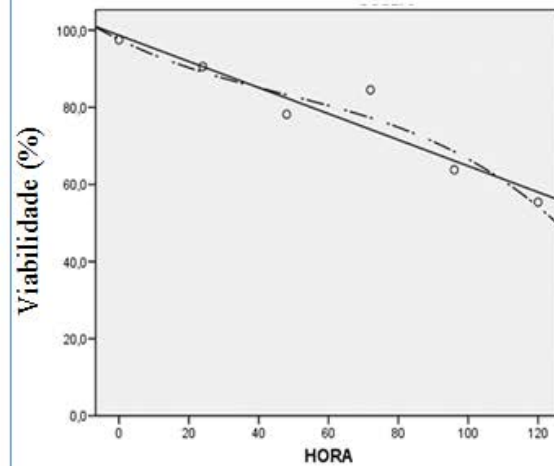
MRSA 3-75



| Dose                | Modelo | R <sup>2</sup> | p *   | IC95%     |
|---------------------|--------|----------------|-------|-----------|
| 1 J/cm <sup>2</sup> | Linear | 0.98           | 0.000 | (51 - 67) |
|                     | Cubica | 1.00           | 0.000 | (60 - 62) |

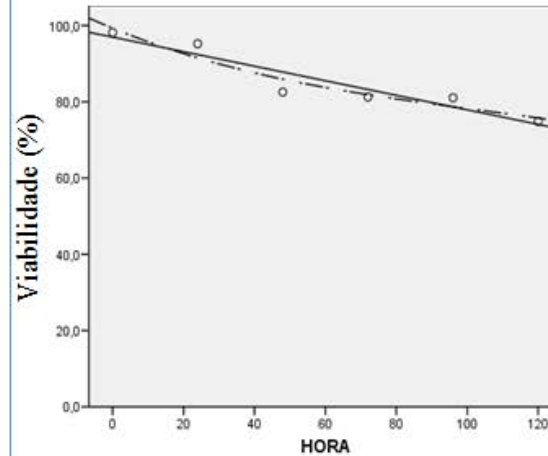
Gráfico Viabilidade MTT (Grupo Dose 3 J/cm<sup>2</sup>)

## NS1



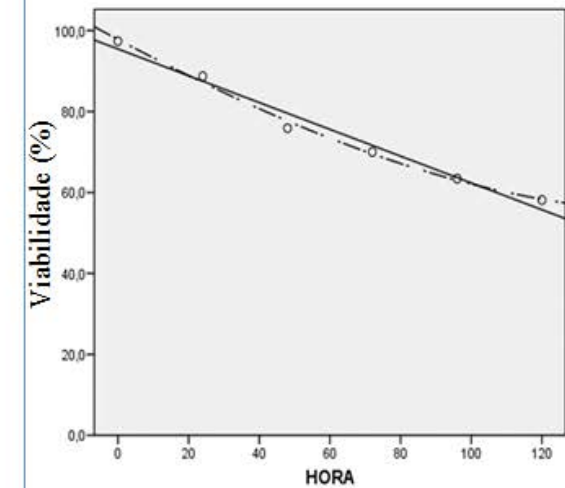
| Dose                | Modelo | R <sup>2</sup> | p *   | IC95%     |
|---------------------|--------|----------------|-------|-----------|
| 3 J/cm <sup>2</sup> | Linear | 0.89           | 0.004 | (38 - 78) |
|                     | Cubica | 0.92           | 0.117 | (11 - 98) |

## MRSA 4-27



| Dose                | Modelo | R <sup>2</sup> | p *   | IC95%      |
|---------------------|--------|----------------|-------|------------|
| 3 J/cm <sup>2</sup> | Linear | 0.88           | 0.005 | (62 - 86)  |
|                     | Cubica | 0.92           | 0.118 | (51 - 100) |

## MRSA 3-75

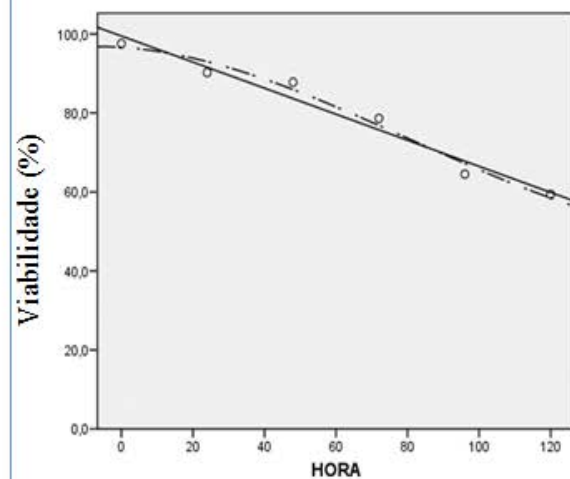


| Dose                | Modelo | R <sup>2</sup> | p *   | IC95%     |
|---------------------|--------|----------------|-------|-----------|
| 3 J/cm <sup>2</sup> | Linear | 0.98           | 0.000 | (47 - 65) |
|                     | Cubica | 0.99           | 0.008 | (48 - 68) |



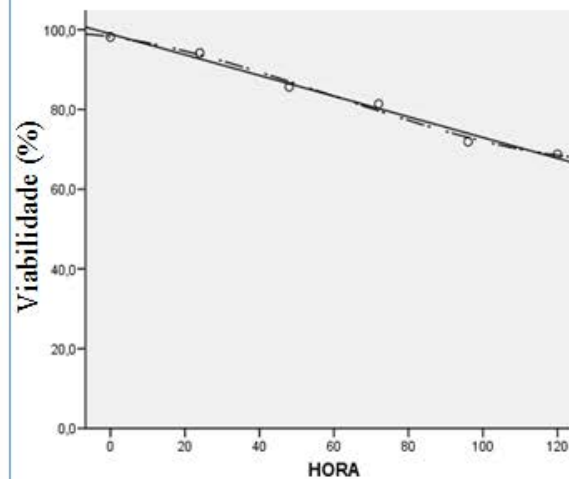
Gráfico Viabilidade MTT (Grupo Dose 5 J/cm<sup>2</sup>)

NS1



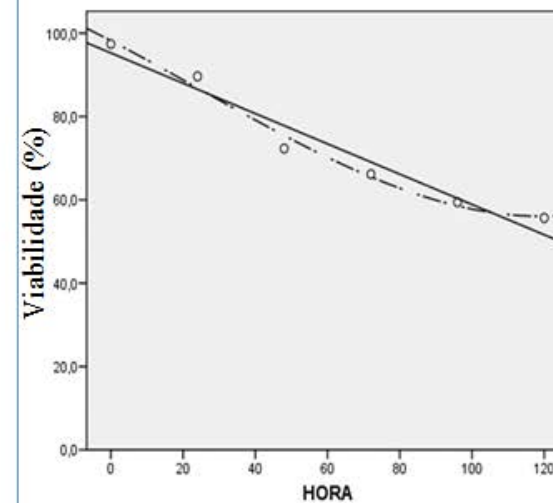
| Dose                | Modelo | R <sup>2</sup> | p *   | IC95%     |
|---------------------|--------|----------------|-------|-----------|
| 5 J/cm <sup>2</sup> | Linear | 0.96           | 0.001 | (49 - 71) |
|                     | Cubica | 0.98           | 0.030 | (38 - 79) |

MRSA 4-27



| Dose                | Modelo | R <sup>2</sup> | p *   | IC95%     |
|---------------------|--------|----------------|-------|-----------|
| 5 J/cm <sup>2</sup> | Linear | 0.99           | 0.000 | (62 - 73) |
|                     | Cubica | 0.99           | 0.014 | (58 - 79) |

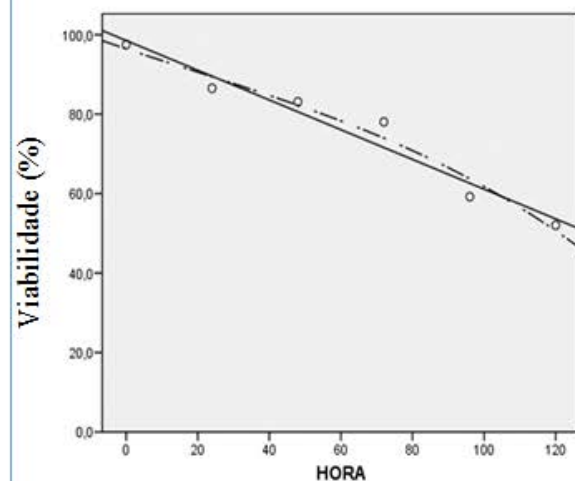
MRSA 3-75



| Dose                | Modelo | R <sup>2</sup> | p *   | IC95%     |
|---------------------|--------|----------------|-------|-----------|
| 5 J/cm <sup>2</sup> | Linear | 0.95           | 0.001 | (37 - 66) |
|                     | Cubica | 0.99           | 0.021 | (37 - 75) |

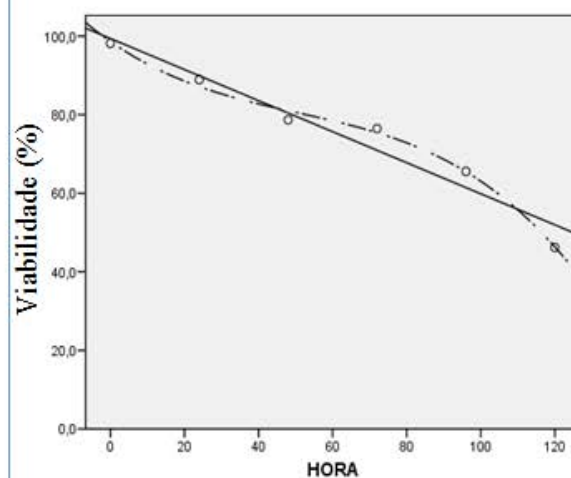
Gráfico Viabilidade MTT (Grupo Dose 10 J/cm<sup>2</sup>)

NS1



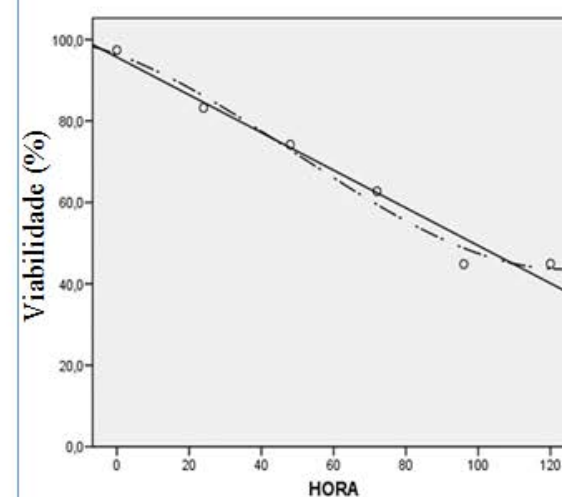
| Dose                 | Modelo | R <sup>2</sup> | p *   | IC95%     |
|----------------------|--------|----------------|-------|-----------|
| 10 J/cm <sup>2</sup> | Linear | 0.95           | 0.001 | (39 - 68) |
|                      | Cubica | 0.97           | 0.050 | (20 - 80) |

MRSA 4-27



| Dose                 | Modelo | R <sup>2</sup> | p *   | IC95%     |
|----------------------|--------|----------------|-------|-----------|
| 10 J/cm <sup>2</sup> | Linear | 0.95           | 0.001 | (36 - 68) |
|                      | Cubica | 0.99           | 0.009 | (33 - 60) |

MRSA 3-75



| Dose                 | Modelo | R <sup>2</sup> | p *   | IC95%     |
|----------------------|--------|----------------|-------|-----------|
| 10 J/cm <sup>2</sup> | Linear | 0.97           | 0.000 | (26 - 54) |
|                      | Cubica | 0.98           | 0.026 | (17 - 70) |



Gráfico Viabilidade MTT (Grupo Dose 20 J/cm<sup>2</sup>)

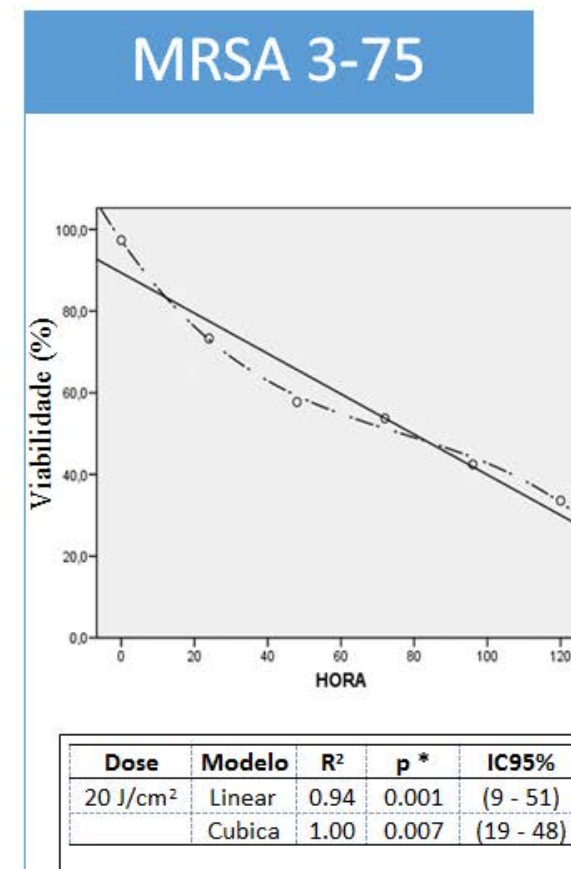
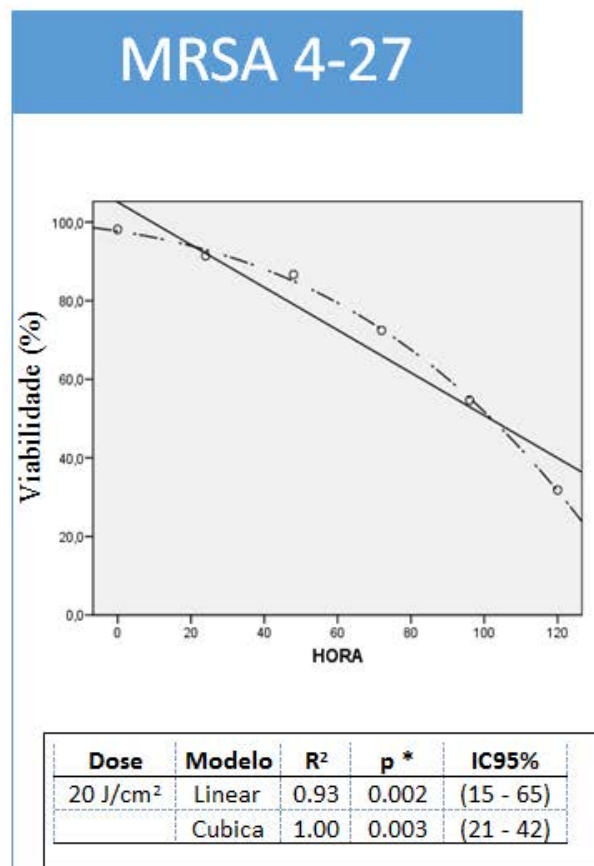
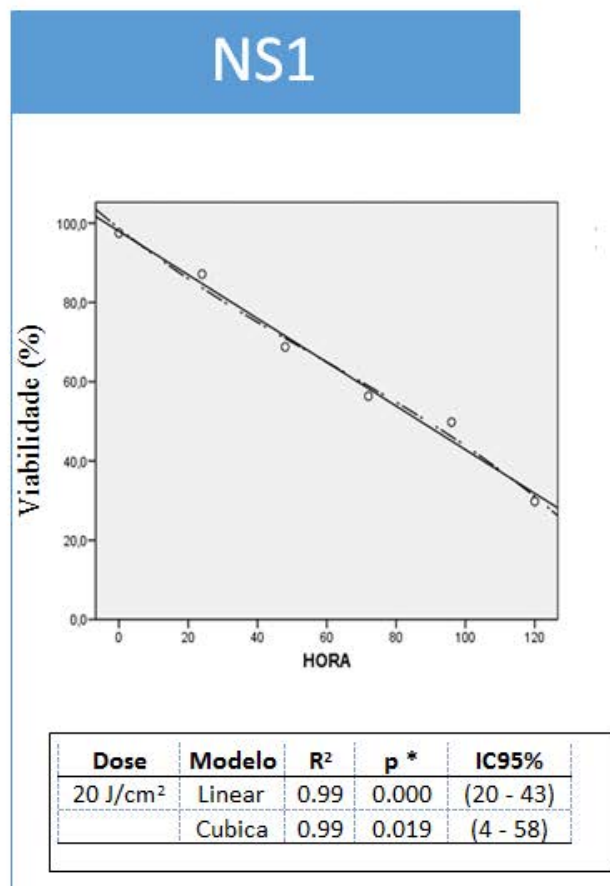


Gráfico 8 – Viabilidade da Cultura. Análises de curvas de sobrevivência

Em 2013, Roehlecke relatou que a ação da luz no comprimento de onda do 450 nm promove rápida formação de ROS em cultivo de células de retina. Depois de 30 e 60 minutos de exposição à luz com densidade de potência de  $1\text{mW/cm}^2$  a produção de ROS aumentou significativamente com acréscimo da morte celular (ROEHLECKE et al., 2013).

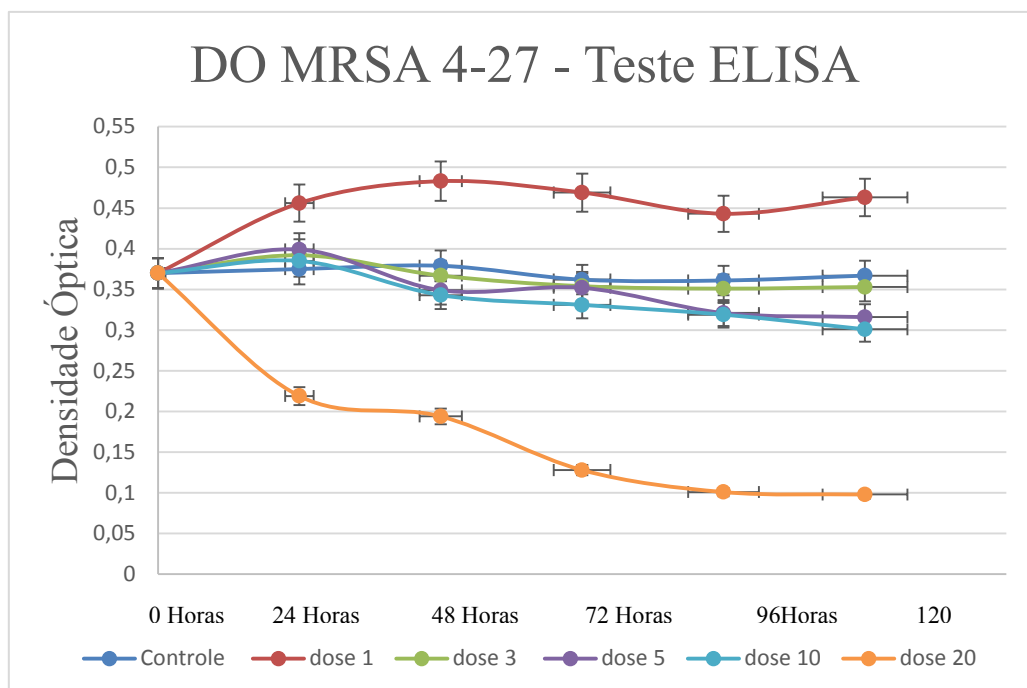
A redução da atividade respiratória mitocondrial também foi relatada em células epiteliais da retina humanas expostas à luz visível com comprimento de onda entre 390-550 nm e densidade de potência  $2,8\text{ mW/cm}^2$  por até 6 h em comparação com as células não tratadas. As lesões do DNA mitocondrial foram máximas em 3 horas. A luz visível promoveu disfunção celular através da ação de espécies reativas de oxigênio no DNA mensageiro com resposta tempo dependente, com evolução para apoptose (GODLEY et al., 2005).

O perfil dos grupos celulares estudados apesar de apresentarem diferenças sutis entre si, não permitiu identificar uma dose que possibilite selecionar híbridos ou NS1 na cultura pós fusão celular.

A bioinibição ocorreu em todos os grupos após  $5\text{ J/cm}^2$  com diferenças não significativas entre os tipos celulares.

A seleção dos híbridos durante o screening por ELISA busca eleger os melhores produtores de Ig que se mantem estáveis na cultura celular após expansão, congelamento e descongelamento.

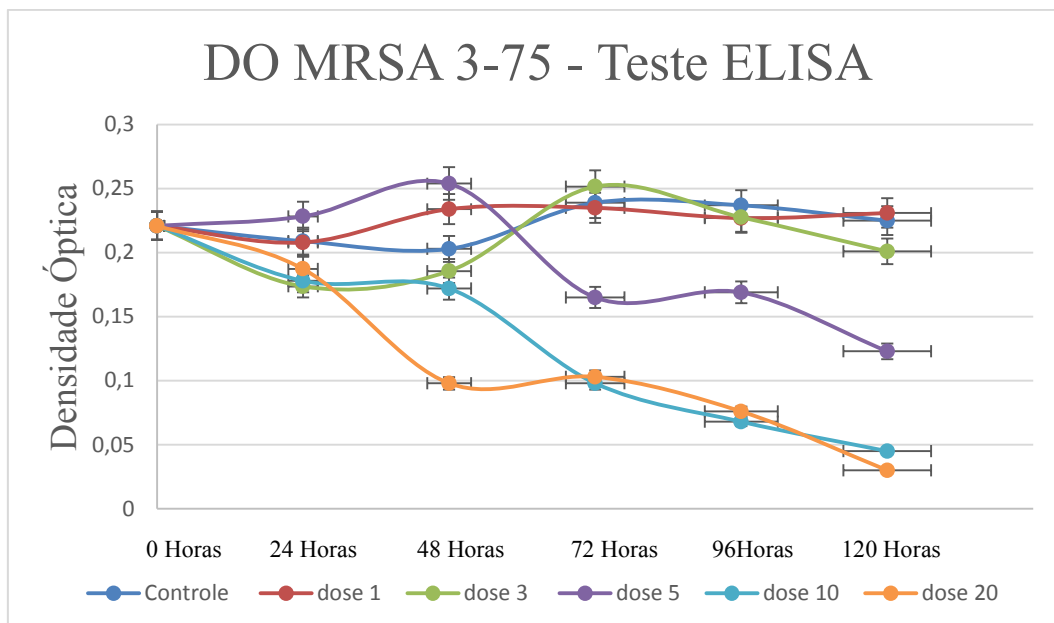
Neste âmbito a bioestimulação foi marcante para a dose de  $1\text{ J/cm}^2$  para NS1 em relação ao número de células. Não obstante, o principal destaque foi o incremento na produção de anticorpos monoclonais das células MRSA 4-27, principal interesse dos laboratórios de bioengenharia que utilizam esta tecnologia (gráfico 9)



**Gráfico 9** – Avaliação da DO pelo teste ELISA do hibridoma MRSA 4-27. Efeito de bioestimulação dose de  $1\text{J}/\text{cm}^2$ .

A resposta positiva do MRSA 4-27 a luz foi confirmada pelas DO e aumento marcante após primeira seção com luz. A produção de anticorpos no sobrenadante de cultura na dose de  $1\text{J}/\text{cm}^2$  foi estatisticamente superior ao grupo não irradiado. Com isto o monoclonal que no *screening* seria descartado, por sua produção ineficaz de anticorpos, pode ser poupado e apresentou significativa melhora no perfil secretor. O hibridoma MRSA 4-27 antes um baixo produtor de Ig passou a ser um monoclonal promissor. Porém o MRSA 3-75 se manteve como baixo produtor de anticorpos (gráfico 10)

Assim a luz 475nm pode ampliar o aproveitamento dos produtos da fusão celular intensificando a produção de anticorpos.

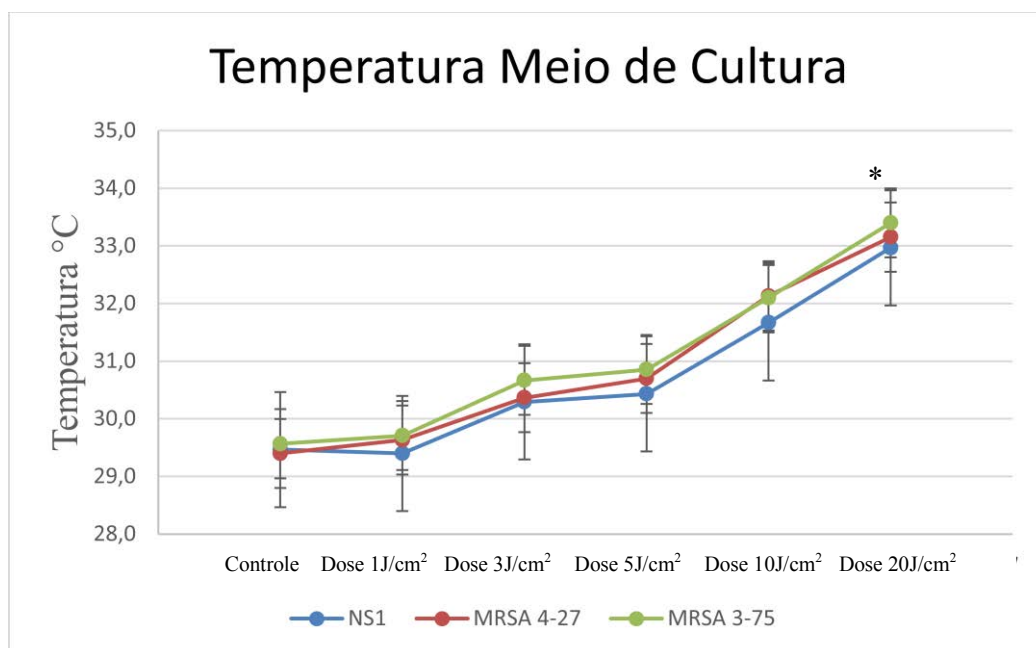


**Gráfico 10** – Avaliação da DO pelo teste ELISA do hibridoma MRSA 3-75. Efeito de bioinibidor para as dose 5, 10 e 20J/cm<sup>2</sup>.

#### 4.5 Medida da Temperatura do meio de cultura

Os mielomas murinos e híbridos são susceptíveis as variações de temperatura. Trabalhos na literatura sugerem que a interação da luz com o meio de cultura e o frasco de cultura podem gerar calor alterando as respostas experimentais (ROTENBERG et al., 2006).

Para analisar um possível efeito da temperatura nas células realizou-se medidas em triplicatas imediatamente após a exposição da luz. O gráfico 11 apresenta os resultados obtidos em nosso estudo.



**Gráfico 11** – Análise da temperatura dos grupos experimentais. \*Diferença significativa entre o grupo e o controle com  $p < 0,05$ .

A homeostasia é capacidade da célula manter seu equilíbrio entre o meio interno e externo dentro de um padrão que permita seu funcionamento. Mudanças externas como, temperatura, pH, concentrações de íons, podem alterar o equilíbrio homeostático desencadeando uma resposta de compensação. Quando bem sucedido, a célula reestabelece o seu equilíbrio, ou caminha para morte.

A mensuração da temperatura do meio de cultura, neste estudo, permitiu descartar a influência externa da temperatura na homeostasia dos grupos experimentais após irradiações.

Estudos anteriores demonstraram que algumas fontes de luz emitindo no comprimento de onda 380nm a 500nm promoveram aumentos significativos, acima de 43°C, em culturas de monócitos quando irradiadas por um longo período(WATAHA et al., 2004; ROTENBERG et al., 2006; WATAHA et al., 2008). Temperaturas nesta faixa podem promover alterações conformacionais de estrutura e de funcionalidade das proteínas sintetizadas(ELLIS; VAN DER VIES, 1991)

Os grupos experimentais demonstraram elevação de temperatura em consequência do aumento da dose, porém somente o grupo irradiado com 20 j/cm<sup>2</sup> apresentou

diferença significativa em relação ao controle. As temperaturas analisadas em todos os grupos não atingiram pontos críticos para promoção alterações no crescimento, processo de síntese ou desnaturação proteica.

## *Conclusão*

## 5.CONCLUSÃO

O LED no comprimento de onda de 475nm não promoveu fotoseleção de mielomas e hibridomas após exposição à luz nas dose de 1, 3, 5, 10 e 20J/cm<sup>2</sup>.

Todos os tipos celulares apresentaram morte celular nas dose superiores a 5J/cm<sup>2</sup>.

O hibridoma MRSA 4-27 apresentou aumento da secreção de imunoglobulinas em aproximadamente 30% em comparação com grupo não irradiado.

Os mielomas foram bioestimulados com acréscimo de seu crescimento celular na dose de 1J/cm<sup>2</sup>

As células irradiadas não alteraram seu perfil morfológico e características de secreção nas doses de 1J/cm<sup>2</sup>. Os híbridos irradiados mantiveram secreção de Ig e o Mieloma Multiplo Murino permaneceu não secretor.

O emprego da luz na produção de anticorpos monoclonais desperta interesse como agente bioestimulador potencializando a capacidade produtiva dos monoclonais.



## *Referências Bibliográficas*

## 6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKROYD, R. et al. The History of Photodetection and Photodynamic Therapy¶. **Photochemistry and Photobiology**, v. 74, n. 5, p. 656-669, 2001.

ADAMS, G. P.; WEINER, L. M. Monoclonal antibody therapy of cancer. **Nat Biotech**, v. 23, n. 9, p. 1147-1157, 09//print 2005.

AGGARWAL, B. B. et al. Damage to mitochondrial electron transport and energy coupling by visible light. **Biochim Biophys Acta**, v. 502, n. 2, p. 367-82, May 10 1978.

AL-WATBAN, F. A.; ANDRES, B. L. Laser biomodulation of normal and neoplastic cells. **Lasers Med Sci**, v. 27, n. 5, p. 1039-43, Sep 2012.

ALKAN, S. S. Monoclonal antibodies: the story of a discovery that revolutionized science and medicine. **Nat Rev Immunol**, v. 4, n. 2, p. 153-6, Feb 2004.

ALLISON, R. R. et al. Photosensitizers in clinical PDT. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, n. 1, p. 27-42, 5// 2004.

ALMEIDA-LOPES, L. et al. Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 29, n. 2, p. 179-184, 2001.

AMORIN, J. C. F. **Ação Fototóxica do LASER em Baixa Intensidade e Diodo de Emissão de Luz (LED) na Viabilidade do Fungo *Trichophyton rubrum*: Estudo "In Vitro"**. 2007. 85 Dissertação (Doutorado). Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)

BAGNATO, V. Uso de LED (Light Emitting Diodes) para terapia bioestimuladora. 2002. **BR n. PI0200200-0**, v. 23, 2002.

BAGNATO, V. S. **As Novas Técnicas Ópticas para as Áreas da Saúde**. 1. São Paulo: Editora Livraria da Física, 2008. 239 ISBN 8588325977.

BAKEEVA, L. E. et al. Formation of gigantic mitochondria in human blood lymphocytes under the effect of an He-Ne laser. **Mol Biol (Mosk)**, v. 27, n. 3, p. 608-17, May-Jun 1993.

BAXTER, G.; DIAMANTOPOULOS, C. **Therapeutic lasers: theory and practice**. Elsevier Health Sciences, 1994.

BIHARI, I.; MESTER, A. R. The biostimulative effect of low level laser therapy of long-standing crural ulcers using helium neon laser, helium neon plus infrared lasers, and noncoherent light: Preliminary report of a randomized double blind comparative study. **LASER THERAPY.**, v. 1, n. 2, p. 97-98, 1989.

BLANCO, M. et al. [Virulence factors and 0 serogroups of *Escherichia coli* as a cause of community-acquired urinary infections]. **Enferm Infecc Microbiol Clin**, v. 13, n. 4, p. 236-41, Apr 1995.

BONNETT, R. et al. Porphyrin sensitizers in tumour phototherapy. Novel sensitizers of the chlorin and bacteriochlorin class with amphiphilic properties. **J Photochem Photobiol B**, v. 6, n. 1-2, p. 29-37, Jun 1990.

BREITBART, H. et al. Changes in calcium transport in mammalian sperm mitochondria and plasma membrane irradiated at 633 nm (HeNe laser). **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 34, n. 2-3, p. 117-121, 7// 1996.

CHATTERJEE, S. R. et al. Lipid peroxidation induced by a novel porphyrin plus light in isolated mitochondria: possible implications in photodynamic therapy. **Mol Cell Biochem**, v. 166, n. 1-2, p. 25-33, Jan 1997.

CHOI, M. S. et al. Comparative study of the bactericidal effects of 5-aminolevulinic acid with blue and red light on *Propionibacterium acnes*. **J Dermatol**, v. 38, n. 7, p. 661-6, Jul 2011.

CHON, J. H.; ZARBIS-PAPASTOITSIS, G. Advances in the production and downstream processing of antibodies. **N Biotechnol**, v. 28, n. 5, p. 458-63, Sep 2011.

CORAZZA, A. **Fotobiomodulação comparativa entre o Laser e LED de baixa intensidade na angiogênese de feridas cutâneas de ratos. 2005.** 2005. 89f. Dissertação de Mestrado, Escola de Engenharia, Universidade de São Paulo, Campus de São Carlos, 2005

CORAZZA, A. et al. Photobiomodulation on the angiogenesis of skin wounds in rats using different light sources. **Photomedicine and laser surgery**, v. 25, n. 2, p. 102, 2007.

CORREIA, J. **Fotodegradação do Photodithazine e citotoxicidade dos fotoprodutos formados após irradiação com LASER.** 2006. 91 Mestrado Instituto de Química de São Carlos-IQSC, USP

DEFFUNE, E. et al. Method for studying anti-complement reagents: use of freeze-thawed sensitized erythrocytes. **Rev Fr Transfus Hemobiol**, v. 35, n. 4, p. 299-309, Jul 1992.

DOUGHERTY, T. J. Studies on the structure of porphyrins contained in Photofrin II. **Photochem Photobiol**, v. 46, n. 5, p. 569-73, Nov 1987.

DOUGHERTY, T. J. et al. Photodynamic therapy. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 90, n. 12, p. 889-905, 1998.

DU, H. Y. et al. Hypericin-mediated photodynamic therapy induces lipid peroxidation and necrosis in nasopharyngeal cancer. **Int J Oncol**, v. 23, n. 5, p. 1401-5, Nov 2003.

ELLIS, R. J.; VAN DER VIES, S. M. Molecular chaperones. **Annu Rev Biochem**, v. 60, p. 321-47, 1991.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicol Pathol**, v. 35, n. 4, p. 495-516, Jun 2007.

ENWEMEKA, C. S.; RODRIGUEZ, O.; MENDOSA, S. The biomechanical effects of low-intensity ultrasound on healing tendons. **Ultrasound Med Biol**, v. 16, n. 8, p. 801-7, 1990.

FARID, S. S. Process economics of industrial monoclonal antibody manufacture. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 848, n. 1, p. 8-18, Mar 15 2007.

FEDOSEYEVA, G. et al. Effect of the He-Ne Laser. **Laser Chem**, v. 5, p. 27-33, 1984.

FREITAS, A. M. C. D. **LIGHT EMMITING DIODE - LED**. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia 2009.

FRIEDMANN, H.; LUBART, R. Competition between activating and inhibitory processes in photobiology. 1996. doi: 10.1117/12.230039. p.60-64.

GODLEY, B. F. et al. Blue Light Induces Mitochondrial DNA Damage and Free Radical Production in Epithelial Cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 22, p. 21061-21066, June 3, 2005 2005.

GROSSMAN, N. et al. 780 nm low power diode laser irradiation stimulates proliferation of keratinocyte cultures: involvement of reactive oxygen species. **Lasers Surg Med**, v. 22, n. 4, p. 212-8, 1998.

GROSSWEINER, L. I. PDT light dosimetry revisited. **J Photochem Photobiol B**, v. 38, n. 2-3, p. 258-68, Apr 1997.

GULSOY, M. et al. The biological effects of 632.8-nm low energy He-Ne laser on peripheral blood mononuclear cells in vitro. **J Photochem Photobiol B**, v. 82, n. 3, p. 199-202, Mar 1 2006.

HENDERSON, B. W.; DOUGHERTY, T. J. HOW DOES PHOTODYNAMIC THERAPY WORK? **Photochemistry and Photobiology**, v. 55, n. 1, p. 145-157, 1992.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 770-776, 10/12/print 2000.

HOCKBERGER, P. E. et al. Activation of flavin-containing oxidases underlies light-induced production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in mammalian cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 11, p. 6255-60, May 25 1999.

JANKO, C. et al. Cooperative binding of Annexin A5 to phosphatidylserine on apoptotic cell membranes. **Phys Biol**, v. 10, n. 6, p. 065006, Dec 2013.

JIANG, Y. et al. Apoptosis of breast cancer cells induced by hypocrellin B under light-emitting diode irradiation. **Photodiagnosis Photodyn Ther**, v. 9, n. 4, p. 337-43, Dec 2012.

JORI, G. et al. Novel approaches towards a detailed control of the mechanism and efficiency of photosensitized processes in vivo. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 102, n. 1, Supplement 1, p. 101-107, 12/27/ 1996.

KAMEYA, T. et al. Effect of different wavelengths of low level laser therapy on wound healing in mice. **Laser Therapy**, v. 7, p. 33-33, 1995.

KARU, T. Photobiological fundamentals of low-power laser therapy. **IEEE Journal of Quantum Electronics**, v. 23, n. 10, p. 1703-1717, 1987.

\_\_\_\_\_. Photobiology of low-power laser effects. **Health Phys**, v. 56, n. 5, p. 691-704, 1989.

KARU, T. Stimulation of metabolic processes by low-intensity visible light: a scientific basis for biostimulation. **Laser Applications in Medicine and Biology**, v. 5, 1996.

KARU, T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 49, n. 1, p. 1-17, 1999.

\_\_\_\_\_. Mitochondrial mechanisms of photobiomodulation in context of new data about multiple roles of ATP. **Photomed Laser Surg**, v. 28, n. 2, p. 159-60, Apr 2008.

KARU, T. Multiple roles of cytochrome c oxidase in mammalian cells under action of red and IR-A radiation. **IUBMB Life**, v. 62, n. 8, p. 607-10, Aug 2010.

KARU, T. et al. Effects of monochromatic low-intensity light and laser irradiation on adhesion of HeLa cells in vitro. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 18, n. 2, p. 171-177, 1998.

KARU, T. I. EFFECTS OF VISIBLE RADIATION ON CULTURED CELLS. **Photochemistry and Photobiology**, v. 52, n. 6, p. 1089-1098, 1990.

KIM, H. K. et al. Protein A-specific monoclonal antibodies and prevention of Staphylococcus aureus disease in mice. **Infect Immun**, v. 80, n. 10, p. 3460-70, Oct 2012.

KNELS, L. et al. Blue light stress in retinal neuronal (R28) cells is dependent on wavelength range and irradiance. **Eur J Neurosci**, v. 34, n. 4, p. 548-58, Aug 2011.

KOHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, v. 256, n. 5517, p. 495-497, 08/07/print 1975.

LABBE, R. F. et al. Laser photobioactivation mechanisms: In vitro studies using ascorbic acid uptake and hydroxyproline formation as biochemical markers of irradiation response. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 10, n. 2, p. 201-207, 1990.

LI, W.; CHEN, H.; WANG, C. Effect of light emitting diode irradiation on proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells. **Journal of Medical and Biological Engineering**, v. 26, n. 1, p. 35, 2006.

LIEBMANN, J.; BORN, M.; KOLB-BACHOFEN, V. Blue-light irradiation regulates proliferation and differentiation in human skin cells. **J Invest Dermatol**, v. 130, n. 1, p. 259-69, Jan 2010.

LIEVENS, P. Effects of laser treatment on the lymphatic system and wound healing. **Laser**, v. 1, p. 12, 1988.

LIZARELLI, R. Protocolos clínicos odontológicos-Uso do laser de baixa intensidade. **Bons negócios Editora Ltda**, v. 4 p. 88, Maio 2010.

LIZARELLI, R. F. Z. et al. Selective ablation of dental enamel and dentin using femtosecond laser pulses. **Laser Physics Letters**, v. 5, n. 1, p. 63-69, 2008.

LOCKWOOD, D. B. et al. Blue light generates reactive oxygen species (ROS) differentially in tumor vs. normal epithelial cells. **Dent Mater**, v. 21, n. 7, p. 683-8, Jul 2005.

LORENZ, U. et al. Functional antibodies targeting IsaA of *Staphylococcus aureus* augment host immune response and open new perspectives for antibacterial therapy. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 55, n. 1, p. 165-73, Jan 2011.

LOW, D.; O'LEARY, R.; PUJAR, N. S. Future of antibody purification. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 848, n. 1, p. 48-63, Mar 15 2007.

LUBART, R.; FRIEDMAN, H.; LAVIE, R. Photobiostimulation as a function of different wavelengths. **Laser Therapy**, v. 12, n. 1, p. 38-41, 2000.

LUBART, R. et al. Changes in calcium transport in mammalian sperm mitochondria and plasma membranes caused by 780 nm irradiation. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 21, n. 5, p. 493-499, 1997.

LUBART, R. et al. Biostimulation of photosensitized fibroblasts by low incident levels of visible light energy. **Laser Therapy**, v. 7, p. 101-106, 1995.

LUBART, R. et al. Effects of visible and near-infrared lasers on cell cultures. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 12, n. 3, p. 305-310, 2/28/ 1992.

MAIER, M.; HAINA, D.; LANDTHALER, M. Effect of low energy laser on the growth and regeneration of capillaries. **Lasers in Medical Science**, v. 5, n. 4, p. 381-386, 1990/12/01 1990.

MANTEIFEL, V.; KARU, T. Structure of mitochondria and activity of their respiratory chain in successive generations of yeast cells exposed to He-Ne laser light. **Biology Bulletin**, v. 32, n. 6, p. 556-566, 2005.

MANTEIFEL, V.; KARU, T. Prolonged Effects of He-Ne Laser Irradiation on Ultrastructure of Mitochondria in Successive Generations of Yeast Cells. **Mitochondrion**, v. 241, n. 10.8, p. 0.001, 2007.

MARQUES, M. et al. Effect of low-power laser irradiation on protein synthesis and ultrastructure of human gingival fibroblasts. **Lasers in surgery and medicine**, v. 34, n. 3, p. 260-265, 2004.

MELLO, J. B. D. et al. Laser de baixa potência; Low-power laser. 2001.

MENEGUZZO, D. T. **Influência do fracionamento da energia de irradiação na fototerapia com laser em baixa intensidade sobre o crescimento de fibroblastos de polpa dentária humana; Influence of the fractioned irradiation energy in the phototherapy with low intensity laser on the growth of human dental pulp fibroblasts**. 2007. Universidade de São Paulo. Faculdade de Odontologia

MENEZES, P. Estudos espectroscópicos e citotóxicos do Photogem® fotodegradado e dos fotoprodutos formados pela irradiação com Laser. **Instituto de Química de São Carlos**, 2001.

MIRO, L. et al. Estudio capilarescópico de la acción de un láser de AsGa sobre la microcirculación. **Inv Clin Laser**, v. 1, n. 2, p. 9-14, 1984.

MIRONOV, A. F.; NIZHNIK, A. N.; NOCKEL, A. Y. Hematoporphyrin derivatives: an oligomeric composition study. **J Photochem Photobiol B**, v. 4, n. 3, p. 297-306, Jan 1990.

MOORE, P. et al. Effect of wavelength on low-intensity laser irradiation-stimulated cell proliferation in vitro. **Lasers Surg Med**, v. 36, n. 1, p. 8-12, Jan 2005.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 12/16/ 1983.

NIEMZ, M. H. **Laser-tissue interactions: fundamentals and applications**. Springer, 2007. ISBN 3540721916.

OHARA, M. et al. Blue light inhibits the growth of skin tumors in the v-Ha-ras transgenic mouse. **Cancer Sci**, v. 94, n. 2, p. 205-9, Feb 2003.

OLSON, J. E.; SCHIMMERLING, W.; TOBIAS, C. A. Laser action spectrum of reduced excitability in nerve cells. **Brain Research**, v. 204, n. 2, p. 436-440, 1/12/ 1981.

OMATA, Y. et al. Intra- and extracellular reactive oxygen species generated by blue light. **J Biomed Mater Res A**, v. 77, n. 3, p. 470-7, Jun 1 2006.

OSBORNE, T. J. K. R. A. G. B. A. **Imunologia de Kuby**. 6 Edição. 2008. 704 ISBN 9788536311913.

PASCHER, T. et al. Protein folding triggered by electron transfer. **Science**, v. 271, n. 5255, p. 1558-60, Mar 15 1996.

PEC, M. K. et al. Induction of apoptosis in estrogen dependent and independent breast cancer cells by the marine terpenoid dehydrothysiferol. **Biochemical Pharmacology**, v. 65, n. 9, p. 1451-1461, 5/1/ 2003.

PEPLOW, P. V.; CHUNG, T. Y.; BAXTER, G. D. Laser photobiomodulation of proliferation of cells in culture: a review of human and animal studies. **Photomed Laser Surg**, v. 28 Suppl 1, p. S3-40, Aug 2010.

POLO, L. et al. Role of Ground and Excited Singlet State Oxygen in the Red Light-Induced Stimulation of *Escherichia coli* Cell Growth. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 257, n. 3, p. 753-758, 4/21/ 1999.

PRADELLI, L.; BÉNÉTEAU, M.; RICCI, J.-E. Mitochondrial control of caspase-dependent and -independent cell death. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, n. 10, p. 1589-1597, 2010/05/01 2010.

PRASHANT. **Research Report on Global and China Monoclonal Antibody Industry, 2013-2017**. Maket Research Reports.bis: China Research and Intelligence Co., Ltd. (CRI): 50 p. 2013.

QUERINO, G. A. **PRODUÇÃO DE ANTICORPO MONOCLONAL MURINO DIRIGIDO CONTRA A PBP2a DO S AUREUS RESISTENTE A METICILINA**. 2013. 61 Mestrado Departamento de Urologia, Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP

REDDY, G.; STEHNO-BITTEL, L.; ENWEMEKA, C. Laser photostimulation of collagen production in healing rabbit Achilles tendons. **Lasers in surgery and medicine**, v. 22, n. 5, p. 281-287, 1998.

RIESEBERG, M. et al. Flow cytometry in biotechnology. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 56, n. 3-4, p. 350-60, Aug 2001.

RITA COSTA, A. et al. Guidelines to cell engineering for monoclonal antibody production. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 74, n. 2, p. 127-38, Feb 2010.

ROCHKIND, S. et al. Systemic effects of low-power laser irradiation on the peripheral and central nervous system, cutaneous wounds, and burns. **Lasers in surgery and medicine**, v. 9, n. 2, p. 174-182, 1989.

ROEHLECKE, C. et al. Stress reaction in outer segments of photoreceptors after blue light irradiation. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. e71570, 2013.

ROTENBERG, S. et al. Extracellular environment as one mediator of blue light-induced mitochondrial suppression. **Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials**, v. 22, n. 8, p. 759-764, 2006.



SCHINDL, A. et al. Low-intensity laser therapy: a review. **J Investig Med**, v. 48, n. 5, p. 312-26, Sep 2000.

SHUKLA, A. A.; THOMMES, J. Recent advances in large-scale production of monoclonal antibodies and related proteins. **Trends Biotechnol**, v. 28, n. 5, p. 253-61, May 2010.

SIBATA, C. et al. Photodynamic therapy: a new concept in medical treatment. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 8, p. 869-880, 2000.

SIPOSAN, D. G.; LUKACS, A. Effect of low-level laser radiation on some rheological factors in human blood: an in vitro study. **J Clin Laser Med Surg**, v. 18, n. 4, p. 185-95, Aug 2000.

SKINNER, S. et al. A preliminary study of the effects of laser radiation on collagen metabolism in cell culture. **Australian Dental Journal**, v. 41, n. 3, p. 188-192, 1996.

SMITH, K. C. The photobiological basis of low level laser radiation therapy. **Laser Therapy**, v. 3, n. 1, p. 19-24, 1991.

SOMMERFELD, S.; STRUBE, J. Challenges in biotechnology production—generic processes and process optimization for monoclonal antibodies. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 44, n. 10, p. 1123-1137, 10// 2005.

SOUZA, A. V. G. D. **DIFICULDADES NA OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS MURINOS ANTI-PROTEÍNA F RECOMBINANTE DO VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO HUMANO (RSV) PARA DIAGNÓSTICO LABORATORIAL**. 2009. 91 Mestrado Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista - Botucatu

SROKA, R. et al. Effects on the mitosis of normal and tumor cells induced by light treatment of different wavelengths. **Lasers in surgery and medicine**, v. 25, n. 3, p. 263-271, 1999.

STEINLECHNER, C.; DYSON, M. The effects of low level laser therapy on the proliferation of keratinocytes. **Laser Therapy**, v. 5, p. 65-65, 1993.

STROBER, W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. In: (Ed.). **Current Protocols in Immunology**: John Wiley & Sons, Inc., 2001. ISBN 9780471142737.

TANG, J. et al. Morphologic changes in collagen fibers after 830 nm diode laser welding. **Lasers in surgery and medicine**, v. 21, n. 5, p. 438-443, 1997.

TRELLES, M. A.; MAYAYO, E. Bone fracture consolidates faster with low-power laser. **Lasers Surg Med**, v. 7, n. 1, p. 36-45, 1987.

VICENTINI-OLIVEIRA, J. C. et al. Taenia saginata: production and characterization of monoclonal antibodies against Taenia saginata metacestode antigens. **Exp Parasitol**, v. 126, n. 4, p. 621-5, Dec 2010.

VISCOR, G.; PALACIOS, L.; PALOMEQUE, J. Effect of He-Ne laser irradiation of blood in vitro on erythrocyte microrheological properties. **Lasers Life Sci**, v. 3, n. 1, p. 31-36, 1989.

WATAHA, J. C. et al. Response of THP-1 monocytes to blue light from dental curing lights. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 35, n. 2, p. 105-110, 2008.

WATAHA, J. C. et al. Biological effects of blue light from dental curing units. **Dent Mater**, v. 20, n. 2, p. 150-7, Feb 2004.

WEBB, C.; DYSON, M.; LEWIS, W. Stimulatory effect of 660 nm low level laser energy on hypertrophic scar-derived fibroblasts: possible mechanisms for increase in cell counts. **Lasers in surgery and medicine**, v. 22, n. 5, p. 294-301, 1998.

WERNER, M. et al. Use of the mitochondria toxicity assay for quantifying the viable cell density of microencapsulated jurkat cells. **Biotechnol Prog**, v. 29, n. 4, p. 986-93, Jul-Aug 2013.

WHELAN, H. et al. Effect of NASA light-emitting diode irradiation on molecular changes for wound healing in diabetic mice. **Journal of clinical laser medicine & surgery**, v. 21, n. 2, p. 67-74, 2003.

WHELAN, H. et al. Effect of NASA light-emitting diode irradiation on wound healing. **Journal of clinical laser medicine & surgery**, v. 19, n. 6, p. 305-314, 2001.

WHITE, A.; HANDLER, P.; SMITH, E. L. Principles of biochemistry. **Academic Medicine**, v. 39, n. 12, p. 1136, 1964.

WU, Y.; TIBREWAL, N.; BIRGE, R. B. Phosphatidylserine recognition by phagocytes: a view to a kill. **Trends in Cell Biology**, v. 16, n. 4, p. 189-197, 4// 2006.

YOSHIDA, A. et al. Reactive oxygen species production in mitochondria of human gingival fibroblast induced by blue light irradiation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 129, n. 0, p. 1-5, 12/5/ 2013.

ZAR, J. H. Multiple comparisons. **Biostatistical analysis**, v. 1, p. 185-205, 1974.

ZHANG, Y. et al. cDNA microarray analysis of gene expression profiles in human fibroblast cells irradiated with red light. **J Invest Dermatol**, v. 120, n. 5, p. 849-57, May 2003.

ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P. Morphological Features of Cell Death. **Physiology**, v. 19, n. 3, p. 124-128, June 1, 2004 2004.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CAMPUS DE BOTUCATU  
FACULDADE DE MEDICINA



FACULDADE DE MEDICINA  
FMB  
1963  
BOTUCATU



CEUA  
Comissão de Ética no Uso de Animais




Criada através da Portaria DFM nº 611 de 13/12/2012

## Certificado

**CERTIFICAMOS** que o (Protocolo CEUA 1037-2013) "Foto seleção de mielomas e hibridomas murinos na produção de anticorpos monoclonais", a ser conduzido por Woner Mion, orientado pela Profª. Drª. Elenice Deffune, com a colaboração de Josy Campanha Vicentini de Oliveira e Vanderlei Salvador Bagnato, está de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA.

Material utilizado neste Estudo: Células provenientes do Laboratoire de Gene D'Intitute National de Transfusion Sangüine (INTS) de Paris.

*Assinatura*

Profª Adjunta Noeme Sousa Rocha  
Presidente no exercício da CEUA

*Assinatura*

Alberto Santos Capelluppi  
Secretário da CEUA

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 29/08/2013

Comissão Ética  
em Exp. Animal  
Fls. nº 28

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P. CEP: 18.618-970 Fone: (14) 3880-1808/3880-1609 e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br